



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Efeitos Subletais do Folidol 600 em  
***Callichthys callichthys*** (Linnaeus, 1758)  
(Pisces, Teleostei)

HELENA CRISTINA DA SILVA

Tese apresentada à Universidade Federal  
do Paraná para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Veterinárias.

CURITIBA  
1989

AO CARLOS E AO  
NOSSE FILHO, COM MUITO CARINHO.

## AGRADECIMENTOS

Ao ilustre Orientador, Prof. Dr. Heitor Segundo G. Medina, pela dedicação e pelos seguros e importantes ensinamentos que me proporcionou durante todas as etapas do meu Curso de Pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Metry Bacila, Coordenador do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela sua colaboração, bem como pelas críticas e sugestões ao presente trabalho.

A Profa. Dra. Edith Fanta, do Departamento de Biologia Celular da Universidade Federal do Paraná, pelo inestimável auxílio prestado e pelos esclarecimentos oferecidos nas etapas de estudos comportamentais.

Ao Prof. Dr. Orisel Curial, pelo auxílio prestado nas fases dos estudos histopatológicos.

Ao Farmacêutico Bioquímico Geraldo Picheth, pelo auxílio prestado quanto ao estudo da metodologia enzimática.

Ao Engo. Químico Charlotta Wahrhaftig e ao Farmacêutico Bioquímico Thalma Krieger pela colaboração e pelo auxílio técnico prestado durante a execução das pesquisas do presente trabalho.

As estagiárias do Departamento de Biologia Celular da UFPR Betina Mehler, Lília Maria Pontoni Wachowicz, Márcia Fabiana Luvizotto, Maria Cristina Cavalcanti, Maria Lúcia Ishida, Sonia Regina Grotzner e Vera Lúcia Bezerra de Vasconcelos, pelo inestimável auxílio prestado em etapas diversas da pesquisa.

Um agradecimento especial à Sonia Regina Grotzner pelos desenhos realizados e à Vera Lúcia Bezerra de Vasconcelos pelo serviço de digitação.

Ao Engo. de Sistemas Joel Szmelsztayn Krieger pelos serviços de impressão.

A Sra. Tânia Mara Schrank, Secretária do Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias pela dedicação que sempre colocou em todas as etapas de nossas atividades.

As seguintes instituições, cujo apoio permitiu a condução e a conclusão das atividades para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

A Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente - SUREHMA, nas pessoas do Sr. Superintendente, Engo. Químico Alberto Baccarim e do Sr. Superintendente Adjunto, Prof. Dr. Urivald Pawlowsky.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão de bolsa de Mestrado e pelo auxílio financeiro concedido para a execução de parte das pesquisas realizadas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, incentivaram e contribuíram para realização desse trabalho.

## CONTEÚDO

I.	INTRODUÇÃO.....	1
II.	MATERIAL E METODOS.....	21
	2.1. Material Biológico.....	21
	2.1.1. Biologia de <u>Callichthys callichthys</u> .....	21
	2.1.2. Coleta, Transporte e Manuseio.....	23
	2.2. Administração do Folídol 600.....	25
	2.2.1. Determinação da Dose Subletal do Folí- dol 600.....	27
	2.3. Metodologia.....	27
	2.3.1. Análise do Comportamento.....	29
	2.3.1.1. Comportamento Normal.....	29
	2.3.1.2. Comportamento de Peixes Intoxicados....	31
	2.3.2. Métodos Analíticos.....	33
	2.3.2.1. Preparo das Amostras de Plasma.....	33
	2.3.2.1.1. Peixes Normais.....	35
	2.3.2.1.2. Peixes Submetidos a Ação do Óleo de Milho e do Folídol 600.....	35
	2.3.2.2. Medida de Atividade da Colinesterase....	36
	2.3.2.3. Medida de Proteína.....	38
	2.3.3. Análise Morfológica.....	38
	2.3.3.1. Coleta de Material para Estudos His- tológicos.....	38
	2.3.3.2. Metodologia Histológica.....	39

III. RESULTADOS.....	41
3.1. Determinação da Dose Subletal do Folidol 600 para <u>Callichthys callichthys</u> .....	41
3.2. Comportamento Normal de <u>Callichthys callichthys</u> .	43
3.3. Comportamento dos Peixes Intoxicados.....	46
3.3.1. Efeito do Folidol 600 no Padrão de Natação de <u>Callichthys callichthys</u> .....	46
3.3.2. Efeito do Folidol 600 sobre o Padrão de Velocidade de natação do <u>Callichthys</u> <u>callichthys</u> .....	51
3.3.3. Efeito do Folidol 600 sobre o Tempo de Repouso do <u>Callichthys callichthys</u> .....	55
3.3.4. Efeito do Folidol 600 no Padrão de Subidas à Superfície do <u>Callichthys callichthys</u> .....	60
3.3.5. Efeito do Folidol 600 sobre o Padrão de Procura de Alimento do <u>Callichthys</u> <u>callichthys</u> .....	64
3.3.6. Efeito do Folidol 600 no Padrão de Respi- ração do <u>Callichthys callichthys</u> .....	68
3.3.7. Efeito do Óleo de Milho nos Padrões de Natação, Velocidade de Natação, Tempo de Re- pouso, Subidas à Superfície, Procura de Ali- mento e Frequência Respiratória.....	72
3.4. Efeito do Folidol 600 sobre a Atividade da Coli- nesterase Plasmática do <u>Callichthys callichthys</u> .	76
3.5. Efeito do Folidol 600 sobre a Morfologia Renal	

e Hepática do <u>Callichthys callichthys</u> .....	79
IV. DISCUSSÃO.....	85
V. SUMARIO E ABSTRACT.....	102
VI. CONCLUSÕES.....	106
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108

## I. INTRODUÇÃO

Desde que CLAUDE BERNARD (1857), descobriu a ação inibitória do cianeto sobre a respiração, fato que foi demonstrado, a nível celular, por WARBURG (1911) com sangue de galinha desfibrinado e ainda com a demonstração de WARBURG (1926) da ação inibitória do monóxido de carbono sobre a citocromoxidase, o mecanismo de ação das drogas passou a ser considerado em termos de lesão bioquímica produzida a nível molecular. Por outro lado, PETERS (1949) ao elucidar o mecanismo de ação dos gases de guerra, Lewisite e Yperite, atribui à inativação dos grupos sulfidrílicos toda a sintomatologia da intoxicação e ao esclarecer as causas responsáveis pela mortandade de bovinos que assolava a África do Sul, PETERS (1952) aponta o fluoracetato presente na seiva do Dichapetalum cymosum, planta venenosa que participava da alimentação do gado, como sendo o princípio ativo inibidor da aconitase, enzima do ciclo de Krebs. Todos esses dados e os demais que se desenrolaram nos estudos dos efeitos produzidos pelas drogas sobre o metabolismo, despertaram interesse para o estudo das lesões bioquímicas e abriram caminho para a síntese e a aplicação dos inibidores metabólicos.

Embora se reconheça que a ação das drogas nos sistemas biológicos repousa numa interação molecular, suas consequências se retratam nas modificações funcionais ou morfológicas que



produzem. Muitas das lesões bioquímicas permanecem ainda desconhecidas, apesar de permitirem, todavia, que se avalie as consequências das interações a que dão lugar.

A descoberta e a síntese dos análogos e dos antimetabólitos, deu ensejo a que se desenvolvessem numerosas substâncias de emprego farmacológico e quimioterápico e, mesmo, de compostos químicos como os pesticidas, de larga aplicação na agropecuária e no combate a diversas endemias.

A partir da descoberta dos organofosforados como agentes anticolinesterásicos, cresceu também, o interesse em empregá-los como inseticidas e, principalmente, em estudar suas propriedades químicas e bioquímicas, sem descartar a possibilidade de serem reconhecidos como potenciais armas de guerra (KOELLE & GILMAN, 1949).

O intensivo emprego dos compostos organofosforados na agricultura, trouxe, como novo aspecto do problema, a iatrogênese do agricultor e a do meio ambiente, CHABOUSSOU (1980).

Além das intoxicações causadas por compostos organofosforados em agricultores, a poluição das águas e dos mananciais e a deposição dos venenos nos organismos aquáticos, especialmente nos peixes, acarretam grandes prejuízos à piscicultura e para a alimentação humana e animal. Ademais, além desses compostos, outros biocidas, solventes tóxicos, metais pesados, detergentes, hidrocarbonetos de petróleo, efluentes industriais e os não menos importantes, representados pelos organoclorados, carbamatos, princípios ativos de plantas como

a rotenona, o piretro, são também de uso amplo. Pela lesão bioquímica, altamente específica, que os organofosforados (Paration, paration metílico, diazinon, malation, diclorvos e uma vasta lista em expansão) causam, o objetivo principal do presente trabalho foi o de estudar os efeitos subletais do Folidol 600 (Paration metílico) em Callichthys callichthys (Pisces, Teleostei).

#### Química dos organofosforados

O tetraetilpirofosfato (TEPP), conhecido desde os meados do século passado, foi desenvolvido em 1937 na Farbenfabriken Bayer, Alemanha, por SCHRADER (ver HOLMSTEDT, 1959). Devido às propriedades nicotínicas que apresentava, o TEPP foi destinado ao uso agrícola, em substituição à nicotina. Se bem que não se tenha revelado eficaz como inseticida, mostrou-se dotado de extrema toxicidade para os mamíferos e pouco resistente à hidrólise espontânea quando em presença de umidade.

Entre os mais importantes compostos sintetizados por aquele pesquisador, estão o paration e seu metabólito ativo, o paraoxon, ambos produtos de baixa volatilidade e estáveis quando em solução aquosa, razão pela qual foram largamente empregados como inseticidas na agricultura. Porém, compostos menos perigosos foram preferidos para uso doméstico.

Os primeiros estudos realizados com o paration demonstraram que esse, quando purificado de seus contaminantes, tornava-se inativo e não inibia a acetilcolinesterase, "in vitro", ao passo que o paraoxon, pelo contrário, continuava ativo. O paration para tornar-se ativo na forma de paraoxon, o faz em função de uma síntese letal que se processa no fígado (DU BOIS et al, 1949), por efeito das oxigenases de função mista do retículo endoplasmático (NEAL, 1967).

O paration, em consequência de sua alta toxicidade para os mamíferos (MURPHY, 1980), qualquer que fosse a via de administração, foi responsabilizado por envenenamento de animais ocorrido em consequência de seu emprego. Por esse motivo, outros organofosforados tomaram-lhe o lugar.

Os compostos organofosforados demonstraram possuir toxicidade elevada para os mamíferos cujos sinais e sintomas de envenenamento se caracterizam pela hiperatividade dos nervos e das junções colinérgicas. Os sinais e sintomas da intoxicação podem ser aliviados pela atropina mediante o bloqueio das ações da droga nos centros receptores muscarínicos, inclusive o aumento das secreções traquiobrônquica e salivar e da broncoconstrição produzindo amplo estímulo dos gânglios autônomos e, em graus moderados, ações centrais. A atropina não exerce qualquer efeito na reativação muscular do animal intoxicado, a qual, juntamente com outros efeitos periféricos e centrais, é removida pela pralidoxima, reativador da acetilcolinesterase.

A fórmula geral dos compostos organofosforados,

inibidores da colinesterase foi estabelecida por SCHRADER (ver HOLMSTEDT, 1959). Os mais significativos representantes do grupo tem suas fórmulas estruturais representadas na Figura 1.

	$\begin{matrix} R1 & \diagdown \\ & P \\ R2 & \diagup \end{matrix} \begin{matrix} = O & (S) \\ \diagdown & \\ & X \end{matrix}$	DL50 em ratos machos (mg/kg) *	
		----- Administração Oral      Dermal	
Paration	$\begin{matrix} C2H5O & \diagdown \\ & P \\ C2H5O & \diagup \end{matrix} \begin{matrix} = S \\ \diagdown & \\ & O-C_6H_4-NO_2 \end{matrix}$	13	21
Paration metílico	$\begin{matrix} CH_3O & \diagdown \\ & P \\ CH_3O & \diagup \end{matrix} \begin{matrix} = S \\ \diagdown & \\ & O-C_6H_4-NO_2 \end{matrix}$	14	67
Diazinon	$\begin{matrix} C2H5O & \diagdown \\ & P \\ C2H5O & \diagup \end{matrix} \begin{matrix} = O \\ \diagdown & \\ & O-C \begin{matrix} \diagup N \diagdown \\    \quad   \\ HC \quad C \begin{matrix} \diagup N \diagdown \\   \\ CH_3 \end{matrix} \end{matrix} \end{matrix}$	108	200
Malation	$\begin{matrix} CH_3O & \diagdown \\ & P \\ CH_3O & \diagup \end{matrix} \begin{matrix} = O \\ \diagdown & \\ & CHCOOC_2H_5 \\ &   \\ & CH_2COOC_2H_5 \end{matrix}$	1375	4444

\* Dados de Murphy (1980)

Figura 1. Estrutura de alguns compostos organofosforados utilizados como inseticidas. R1 e R2 podem ser alquil, alcôxi, amida, mercaptana ou outros grupos e X pode ser um grupamento halogeneto, cianeto, tiocianato, fenôxi, tiofenôxi, fosfato ou carboxilato.

## Mecanismo da intoxicação organofosforada

A acetilcolina atua como neurotransmissor nas sinapses e nas junções neuromusculares e, bem assim, o neurohormônio colinérgico, que é o transmissor dos impulsos nervosos nas placas motoras terminais que se estabelecem entre o nervo e o músculo.

Sabe-se que, a estimulação das fibras simpáticas resulta, primeiro, na liberação da acetilcolina que, por sua vez, acarreta a liberação da norepinefrina para atuar sobre os órgãos efetores.

Na terminação do axônio colinérgico, a membrana pré-sináptica se encontra separada das pós-sináptica por uma distância aproximada de 500 Å. As vesículas de acetilcolina se rompem com a chegada do impulso nervoso libertando o neurohormônio que se difunde para a membrana pós-sináptica que se despolariza. Essa despolarização acarreta um potencial de ação prolongado.

Em íntima associação com a acetilcolina existem duas enzimas, a colina acetiltransferase (E.C.2.3.1.6.) ou colina acetilase que catalisa a síntese da acetilcolina a partir da colina e da acetil-S-CoA e a acetilcolinesterase (E.C.1.1.7.) que catalisa a hidrólise do neurohormônio colinérgico (Fig. 2).

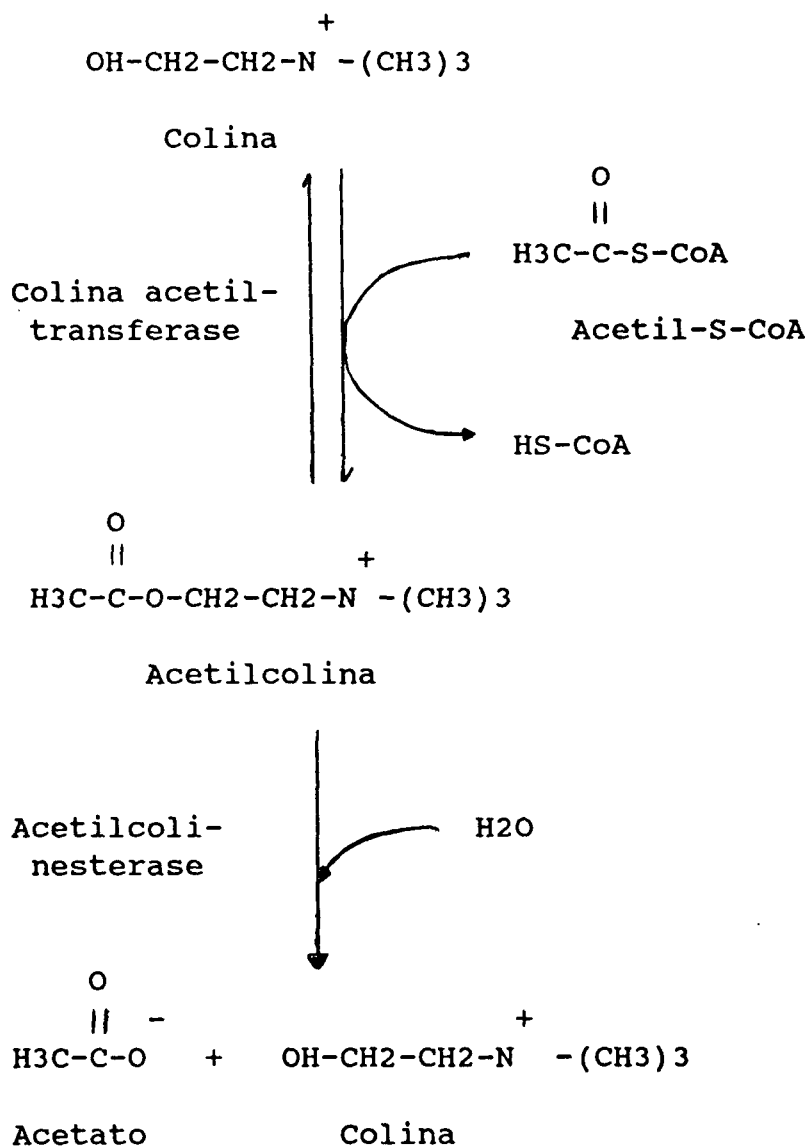


Figura 2. Síntese e degradação da acetilcolina.

A acetilcolinesterase é uma das enzimas de mais alto "turnover" que se conhece ( $25000 \text{ s}^{-1}$ ) o que significa que ela cinde uma molécula de acetilcolina a cada  $40 \mu\text{s}$ . É uma enzima de difusão controlada ( $K_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = 2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). O seu elevado número de reconversão ("turnover") é essencial para a rápida repolarização da membrana pós-sináptica. As sinapses repolarizadas tem, nas condições normais de polarização, a capacidade para transmitir 1000 impulsos na fração de um milissegundo.

Para que a acetilcolina preencha as funções de agente neurohumoral na transmissão juncional periférica, o éster deverá ser removido ou inativado dentro dos limites de tempo impostos pelas características juncionais neuroefetoras viscerais, placas motoras terminais e vários tipos de neurônios. Em consequência dos resultados observados durante a intoxicação experimental realizada em ratos, os efeitos tóxicos do paration permitiram supor que o mecanismo de ação do referido veneno tivesse como ponto de lesão bioquímica específica, os tecidos nervosos onde é promovida redução da atividade colinesterásica, deixando livre a acetil colina endógena, especialmente no cérebro (DU BOIS et al, 1949).

Pesquisas subsequentes, empregando outros inseticidas do mesmo grupo (Paration metílico), revelaram que, em determinadas doses, a colinesterase era inibida in vivo, mecanismo que se mostrou comum para justificar a ação tóxica das referidas substâncias.

As substâncias anticolinesterásicas penetram nos tegumentos em virtude da lipossolubilidade que possuem e, por isso, são prontamente absorvidas quando na forma de vapor, aerosol, pó ou soluções aquosas em contacto com as mucosas dos diferentes aparelhos e tecidos de revestimento.

Entre os anticolinesterásicos, o diisopropilfluorofosfato (DFP) é, talvez, o composto mais conhecido e mais amplamente estudado, em virtude de ter sido sintetizado durante a Segunda Guerra Mundial, quando as ações

tóxicas dos fluoroacetatos foram investigadas. Essa linha de investigação foi desenvolvida quando da necessidade de se prepararem armas de aplicação tática. E assim que, durante aqueles episódios, certas propriedades apresentadas pelo DFP tornaram-no particularmente valioso como instrumento de pesquisa, incluindo-se a inativação virtualmente irreversível que produz por efeito da alcoilfosforilação da acetilcolinesterase e de outras esterases e, ainda, a elevada lipossolubilidade que possui favorecendo quase que especificamente sua penetração no sistema nervoso central.

Os gases nervosos Tabuna (dimetilamidoetoxi-fosforilcianeto) e Sarina (isopropoxi-metil-fosforil fluoreto) são conhecidos como os mais potentes agentes tóxicos sintéticos para o homem e para os animais, inibindo, irreversivelmente, a acetilcolinesterase.

As colinesterases se encontram vinculadas a duas enzimas principais que catalisam reações diferentes.

1) A acetilcolina hidrolase ou acetilcolinesterase ou colinesterase verdadeira (E.C.3.1.1.7.), atua sobre uma variedade de esterases acéticas, catalisando, também, reações de transacetilação. Nas junções neuromusculares e nas sinapses nervosas, a acetilcolinesterase catalisa a reação:



e está presente nos eritrócitos, na junção neuromuscular e nos numerosos sítios onde a acetilcolina exerce outras funções.

2) A acilcolina acil-hidrase, pseudocolinesterase ou



esterase sérica (E.C.3.1.1.8.), atua sobre uma variedade de ésteres da colina bem como, sobre alguns outros compostos:

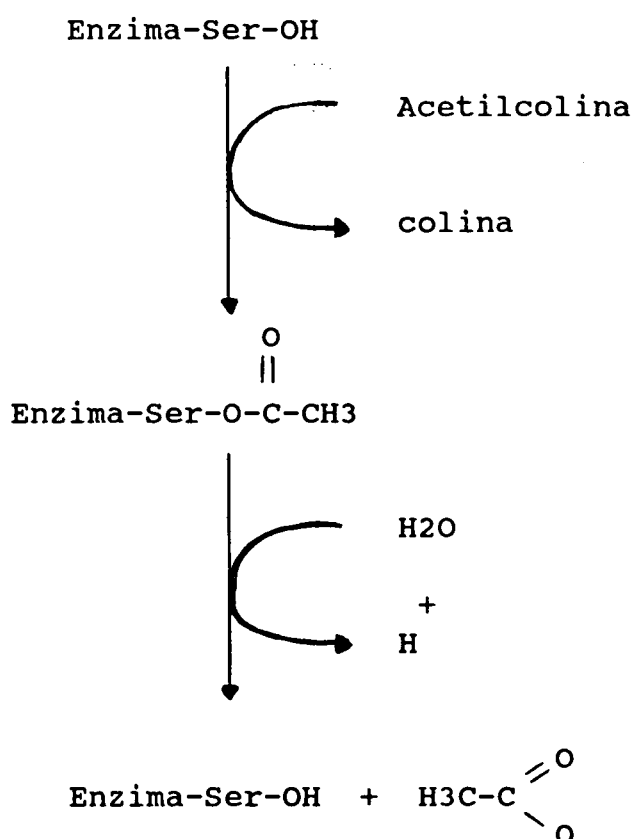


Está presente nos diferentes tipos de células da glia, ou células satélites, porém, em limitada extensão nos elementos neuroniais dos sistemas nervosos central e periférico, no plasma, no fígado e em outros órgãos.

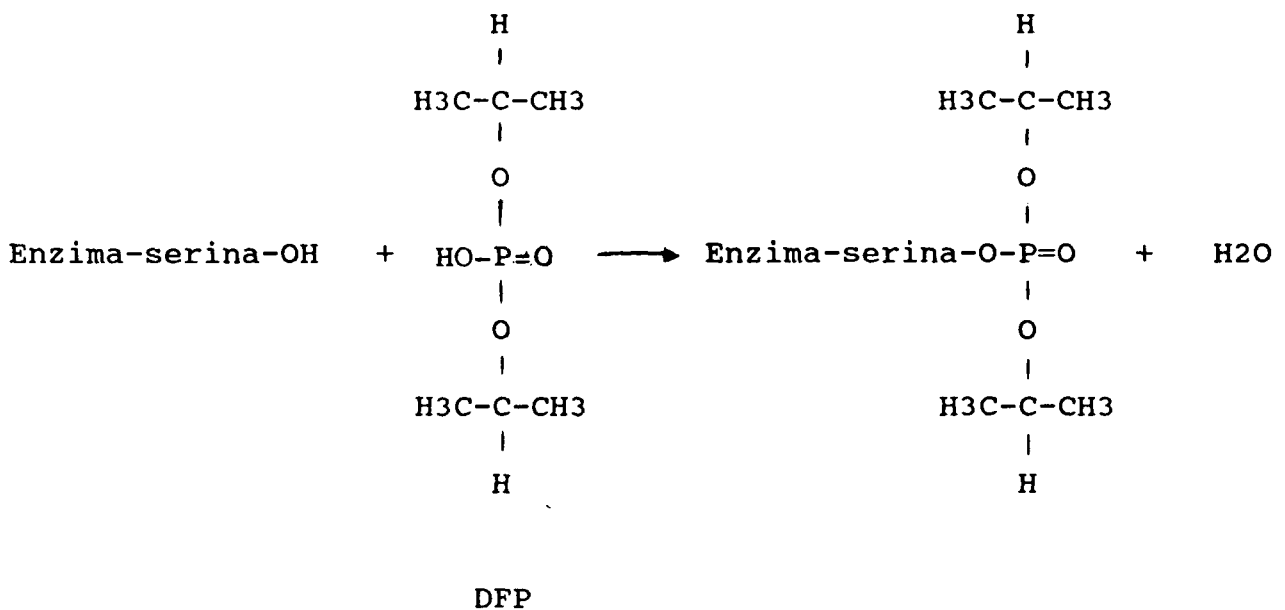
Embora, estudos iniciais tenham permitido isolar a forma pura de uma acetilcolinesterase, a partir do órgão elétrico do poraquê, *Electrophorus electricus* (LEUZINGER et al, 1968), sabe-se atualmente que a forma inativa da enzima é uma estrutura mais complexa.

O centro ativo da acetilcolinesterase consiste de um sítio negativo que atrai o grupo quaternário da colina através de forças coulômbicas e hidrofóbicas e, num sub-sítio esterásico, ocorre ligação nucleofílica no carbono acílico do substrato. O mecanismo catalítico assemelha-se aos de outras serinas esterásicas nas quais o grupo hidroxila da serina torna-se altamente nucleofílico através de um sistema de carga alternada que envolve a aposição de um grupo imidazol e, possivelmente, de um grupo carboxílico da enzima. Durante o ataque enzimático sobre o éster, forma-se um substrato intermediário tetraédrico que se transforma em uma enzima acetilada, com a liberação concomitante de colina. A enzima acetilada é lábil para a hidrólise, dando, em resultado, a formação de acetato e da enzima ativada.

O mecanismo de ação da acetilcolinesterase está ligado a um resíduo de serina em seu sítio ativo, através de cuja hidroxila, forma-se acetil enzima intermediária, com liberação de colina:



É justamente nesse ponto que reside a ação dos inibidores organofosforados, como o paration metílico. É assim que, em razão da ligação covalente que se forma entre a hidroxila da serina do sítio ativo da acetilcolinesterase, com o fósforo dos compostos organofosforados, a enzima é irreversivelmente inibida, impedindo a repolarização da membrana pós-sináptica:



A inibição da acetilcolinesterase por compostos organofosforados foi demonstrado pela primeira vez, por METCALF (1955).

#### Efeitos dos compostos organofosforados em peixes

Em razão da contínua contaminação dos cursos de água, lagos e mananciais por inseticidas organofosforados, muitos estudos tiveram lugar procurando conhecer os efeitos produzidos pelos referidos venenos, particularmente nos peixes.

Estudos de PICKERING et al (1962), sobre a toxicidade de inseticidas organofosforados, realizados em peixes Pimephales promelas, Lepomis macrochirus, Carassius auratus e Lebistes reticulatus, permitiram estabelecer os valores dos limites de tolerância e a sensibilidade dos peixes para um particular composto, limites esses que variaram de acordo com a idade, com o

peso e com outros parâmetros referentes à composição e à forma dos produtos.

ALABASTER (1969), utilizando o peixe Rasbora heteromorpha (arlequim), procedeu ao estudo com diversos organofosforados para determinação, pelo teste de fluxo contínuo, os valores de CL em ppm/48 horas obtendo os resultados seguintes: Azinfosmetil (20% de ingrediente ativo), 0,38; Clorfenvinfos (92%), 0,27; Formotion (25%), 1,2; Etion, 0,52; Bromofos, 0,62; Fosalone, 2,4; Stirofos, 4,3; Diclorvos (83%), 7,8; Demeton-metilico (50%), 13,0; Malation (50%), 13,0; Mevinfos (99,5%), 11,5; Dimetoato (32%), 27,0; Manazon (70%), 220 e Dicrotofós, 1000.

Os efeitos fisiológicos produzidos pelos inseticidas organofosforados sobre diversas espécies de peixes Micropterus salmoides, Lepomis macrochirus, Notemigonus crysolencas, Carassius auratus, Pimephales promelas foram objeto de estudo de WEISS (1961) que determinou as variações nos níveis da atividade da acetilcolinesterase no encéfalo desses animais bem como a recuperação da enzima após a exposição ao Paration, Clortion, Dizinon, Co-Ral, Malation, Gution, EPN, DDVP, Demeton, Delnav, Di-Syston e Dipterex.

WILLIAMS & SOVA (1966) determinaram, na Carolina do Sul, os níveis de acetilcolinesterase no encéfalo de peixes coletados em águas poluídas por grande variedade de compostos poluentes, entre os quais os organofosforados, observando que os peixes coletados nas águas poluídas mostraram uma atividade

enzimática 46,8% menor em comparação com as mesmas espécies que foram coletadas em águas supostamente menos poluídas.

BENKE & MURPHY (1974) estudando a ação anticolinesterásica do paration, paration metílico e azinfosmetil no encéfalo e tecido muscular de peixes Lepomis gibbosus e em camundongo, observaram que a velocidade do início da inibição da acetilcolinesterase não explica a grande toxicidade do paration e do azinfosmetil comparados com os resultados do paration metílico na espécie de peixe estudada. A velocidade do início e da recuperação da inibição da acetilcolinesterase pelos 3 pesticidas em cérebro e músculo de peixe foi mais lenta do que a observada no camundongo.

POST & LEASURE (1974) observaram que a contaminação dos lagos, rios ou água correntes pelo malation não produziu, de imediato, perda de peixes, porém resultou na inabilidade dos peixes em procurarem alimento, manterem sua estabilidade nos fluxos de água corrente ou de escaparem dos predadores. Assim, o peixe pode morrer como consequência indireta da toxicidade subletal do inseticida. Por outro lado, foi observado ser necessário período mais ou menos longo para que os salmonídeos estudados recuperassem os níveis de acetilcolinesterase encefálica, tempo esse que variou com as diferentes espécies de peixes. Assim, Salvelinus fontinalis recuperou-se mais rapidamente do que os demais peixes experimentais. Apesar disso, foram necessários 25 dias para que o peixe, com maior inibição da acetilcolinesterase encefálica, recuperasse os níveis de

atividades normais. Entretanto, o Salmo gairdneri e o Oncorhynchus kitusch, necessitaram, aproximadamente, de 35 a 42 dias para total recuperação respectivamente. VERMA et al (1979), estudando os efeitos do malation, do zolone e do rogor em Channa gachua, Cirrhina mrigala, observou que os níveis da atividade da acetilcolinesterase também se recuperaram, mas não completamente, após sete dias de exposição.

KABEER AHAMMAD SARIB & PRASADA RAO (1980) estudaram na Tilapia mossambica e, em termos comparativos com a eserina, a toxicidade sub-aguda do malation e a inibição da acetilcolinesterase no encéfalo, no músculo, nas guelras e no fígado, estabelecendo vários dados cinéticos a respeito.

COPPAGE et al (1975) observaram que a atividade da acetilcolinesterase decrescia consideravelmente quando peixes eram expostos a concentrações subletais de malation. O'BRIEN (1967) atribuiu os referidos efeitos a uma ação direta do malation sobre a enzima. PALAWSKI et al (1983) estabeleceram em Salmo gairdneri a sobrevida e os parâmetros comportamentais deixados após exposição aguda ao paration metílico, ao trifenilfosfato e ao S,S,S-tributilfosforotritioato, um organofosforado alifático desfolhante.

SALTE et al (1987) tratando Salmo gairdneri e Salmo salar de uma ectoparasitose produzida por um copépodo, Lepeophtheirus salmonis, observaram e estudaram a inibição da acetilcolinesterase e a morte dos peixes produzidas pelo Neguvon.

A quase totalidade dos trabalhos realizados em peixes

sob a ação dos pesticidas organofosforados, basearam-se nos efeitos mortais dos referidos venenos, deixando sem respostas os dados funcionais, talvez os mais importantes. Os efeitos enzimáticos são, na sua maioria, funcionais e não morfológicos, salvo no caso em que as lesões são produzidas pela ação direta dos solventes, muitas vezes tão ou mais tóxicos que a própria droga ativa, MURTY (1986).

Como não poderia deixar de ser, os estudos do presente trabalho foram encaminhados no sentido de interpretar as alterações fisiopatológicas, externadas em sinais e sintomas, dos efeitos da intoxicação subletal causada pelo Folidol 600 (Paration metílico) no Callichthys callichthys. Aliás, FONTAINE (1980) preconiza o estudo quantitativo da sintomatologia externada em sinais e sintomas em situações de intoxicações subletais pela poluição do ambiente marinho.

Estudos de biologia comportamental de peixes são baseados em sinais e sintomas que esses animais desenvolvem em situações normais, (BAERENDS, 1971) e nas alterações que experimentam quando submetidos à ação de diferentes agentes físicos e químicos. Entre os dados comportamentais correntemente analisados estão a atividade de natação, o período de repouso, as mudanças de coloração, o estado de alerta e de defesa, os trismas musculares, a frequência de saltos e a alimentação, entre outros.

FANTA-FEOFILOFF (1983) analisou o efeito da temperatura e da redução dos níveis de oxigênio em Pimelodus

maculatus, Rhambdia hilarii, Nanorhambdia guttata (bagres de água doce), e FANTA-FEOFILOFF (1983) estudaram mudanças comportamentais com a elevação de temperatura em Genidens genidens (bagre branco). O efeito da salinidade no comportamento e no consumo de oxigênio por Mugil curema (tainhota) foi estudado por FANTA-FEOFILOFF et al (1986). Em peixes antárticos, a variação de oxigênio residual em tecido muscular em relação à temperatura e a seu efeito sobre o comportamento de Notothenia neglecta foram determinados por LUCCHIARI et al (1989) e por FANTA et al (1989), enquanto que os efeitos dos níveis de oxigênio e de CO<sub>2</sub> ambientais sobre a oxigenação tecidual de diversos Notothenidae (N. neglecta, N. rossi marmorata, N. gibberifrons, Trematomus bernacchii e T. hansonii) foram estudados por FANTA et al (1989).

Assim, com base nos estudos do comportamento normal de peixes, é muito promissora a análise das alterações do comportamento desses animais quando submetidos à ação de diferentes substâncias tóxicas.

Nesse particular, algumas contribuições podem ser mencionadas. SYMONS (1973) estudou o comportamento do Salmo salar exposto ao Fenitrothion e RAND (1977) observou o comportamento locomotor de Carassius auratus quando exposto a concentrações subagudas de Paration e, finalmente, LINGARAJA & VENUGOPALAN (1978) analisaram algumas alterações comportamentais induzidas pelo organofosforado dimetoato, pelo organoclorado DDT e pelo carbamato, carbaril em peixes Therapon jarbua.



As alterações histológicas observadas em peixes, consequentes aos efeitos dos pesticidas, permitiram orientar o diagnóstico das lesões bioquímicas produzidas e os respectivos mecanismos de ação.

ELLER (1971) descreveu em, trutas tratadas com Endrin, alterações estruturais de vários órgãos e as lesões apresentadas pelas guelras de teleosteos de água doce. COUCH (1975) estudou os efeitos histopatológicos produzidos por pesticidas em fígado de peixes, concluindo que muitos deles não são específicos. Por outro lado BUHLER et al (1969) já tinham descrito degenerações localizadas nos túbulos contornados distais do rim, bem como diminuição do volume hepático em salmões jovens tratados com dieta à base de DDT. WEIS (1974), estudando em microscopia eletrônica o fígado de "guppies" (Lebistes reticulatus), expostos ao DDT, não obteve resultados histopatológicos característicos.

KENDALL (1975 e 1977) injetou metil-mercúrio pela via intraperitonal em Salmo gairdneri, fato que resultou no aparecimento de necroses de células tubulares do rim bem como do tecido pancreático exócrino. KAMARAGURU et al (1982), estudando em peixes os efeitos de concentrações subletais de permetrin verificou apenas modificações histológicas em guelras, porém, ausência de modificações renais e hepáticas.

MEDINA et al (1988) encontraram alterações estruturais e ultra estruturais produzidas no tecido hepático e renal de peixes e mamíferos intoxicados com herbicida fitohormonal.

ANEES (1978) em trabalhos experimentais utilizando organofosforados - diazinon, paration metilico e dimetoato - administrados em concentrações subletais e crônicas observou em Channa punctatus lesões hepáticas caracterizadas pelo aparecimento de vacúolos, diminuição do volume do fígado, prejuízo do suprimento de sangue, inclusões granulares citoplasmáticas e aspecto espumoso dos tecidos.

Percebe-se que, através dos estudos até o momento realizados, torna-se difícil obter o verdadeiro significado das alterações morfológicas induzidas por pesticidas organofosforados. SPRAGUE (1971) também enfatizou a falta de informações básicas da histologia de peixes, o que torna difícil a interpretação de qualquer mudança observada.

Pela análise já procedida, chegou-se à conclusão de que os sistemas abertos, quando agredidos, reagem e se adaptam funcional e morfológicamente aos efeitos produzidos pela agressão e externam o sofrimento por meio de sinais e sintomas de acordo com a equação biológica geral (MEDINA, Comunicação pessoal):

Agressão + Bioindicador → Lesão molecular + Sinais e sintomas

O diagnóstico da causa responsável pelo impacto ambiental químico ou de qualquer outra natureza é apontado pelo próprio ambiente mediante o estabelecimento de uma anamnese e de uma semiologia ambiental.

Nas agressões ao meio ambiente, é obrigatório que se reconheçam cuidadosamente os aspectos e as facetas dos fenômenos que mudaram as características regionais e naturais do conjunto e

bem assim aquelas que se relacionam com os componentes das biocenoses e que são próprias à cada espécie de bioindicadores aquáticos ou terrestres.

No presente trabalho optou-se por estudar as alterações comportamentais do peixe tamboatá (Callichthys callichthys) por ser um peixe nativo, de fácil adaptação em laboratório, resistente ao "stress" do manejo e do transporte, altamente estimulado pela presença do alimento e condicionado aos preâmbulos da alimentação (Fig. 10).

Foi realizado também um estudo bioquímico da inibição da colinesterase plasmática e o estudo histopatológico de possíveis alterações induzidas pelo Folidol 600 utilizado, principalmente por ser um produto formulado, já que não se tem conhecimento de estudos a respeito do peixe tamboatá frente a esse pesticida.

Nesse sentido, procurou-se sistematizar no tamboatá os sinais e os sintomas da intoxicação por compostos organofosforados, tão bem pronunciada em mamíferos, usando o Folidol 600, um produto comercial que contém como princípio ativo o Paration metílico. Foi produzido pela Bayer em 1952 e registrado, pela primeira vez, no Brasil em 1959. O Folidol 600 foi recomendado para uso em 42 culturas, contra uma série de pragas sugadoras e de acordo com publicação da Superintendência dos Recursos Hídricos e Meio Ambiente - SUREHMA (1984), foi o inseticida mais comercializado no Estado e, portanto, de uso mais amplo na agricultura paranaense.

## II. Material e Métodos

### 2.1. Material Biológico

#### 2.1.1. Biologia de *Callichthys callichthys*

Para os experimentos do presente trabalho, foi utilizado o *Callichthys callichthys*, (LINNAEUS, 1758) peixe Siluriforme da família Callichthidae, vulgarmente denominado de tamboatá, tamoatá, tambuatá ou ainda, soldado do nordeste. O tamboatá habita diversos rios brasileiros, dentre os quais os da bacia do Paraguai, na região do Pantanal Matogrossense, onde é muito utilizado como isca na captura de peixes de maior porte, como o *Salminus* sp. (dourado).

Atingindo, raramente, mais de 20 cm de comprimento (Fig. 3), o tamboatá possui hábitos alimentares noturnos e o corpo revestido de duas séries de placas ósseas verticais e superpostas. Nas épocas de seca, quando o nível das águas baixa, o tamboatá tem a propriedade de enterrar-se no lodo, escapando assim, aos efeitos da desidratação. Eventualmente, percorre longos trajetos em busca de água, graças a um tipo de respiração auxiliar que possui (PATURLE, 1975), em razão de um processo de adaptação e de vascularização do tubo digestivo que lhe permite respiração auxiliar.

O tamboatá revelou-se um animal experimental adequado, por ser resistente à punções cardíacas diárias para obtenção do sangue necessário às determinações de colinesterase plasmática estudadas neste trabalho.

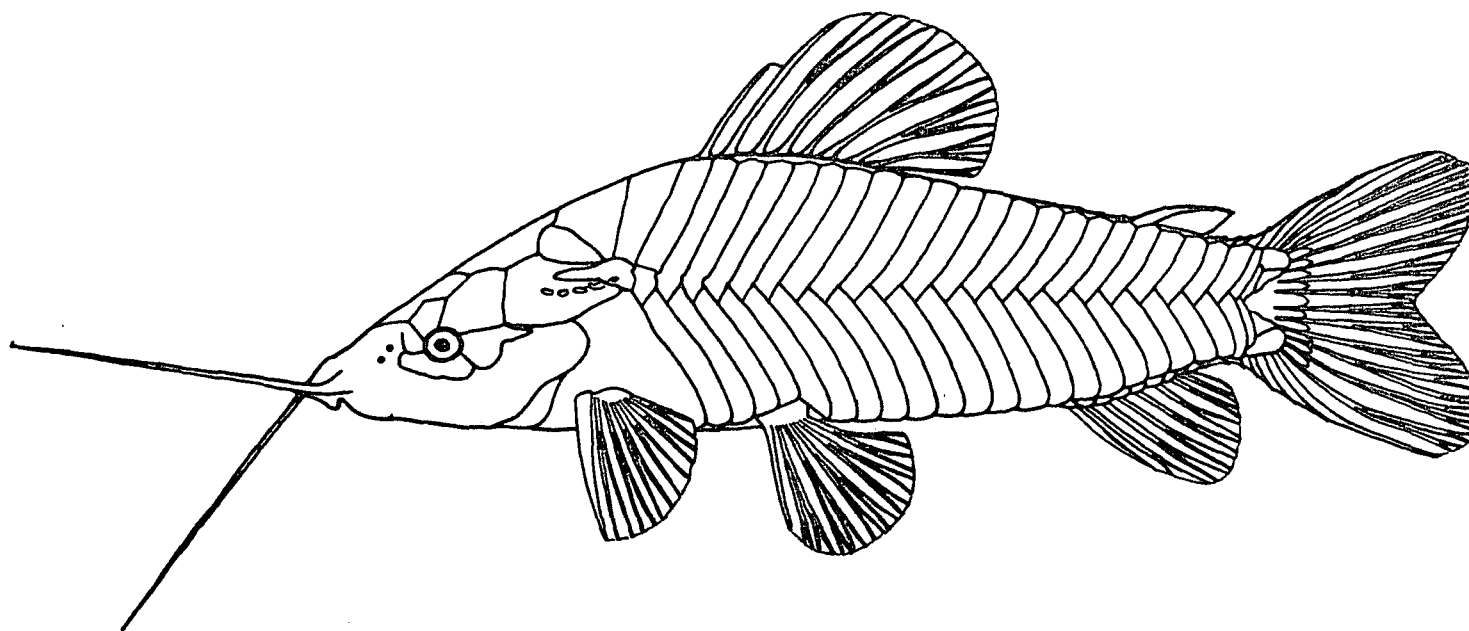


Figura 3. Callichthys callichthys (Teleostei, Siluriforme) da família Callichthidae, peixe de água doce cujo habitat principal é o da bacia do rio Paraguai, região do Pantanal Matogrossense.

### 2.1.2. Coleta, transporte e manuseio

Os exemplares de C. callichthys utilizados no presente trabalho foram coletados no Rio Miranda, MS, próximo ao Passo do Lontra (56°O, 20°S) entre dezembro e janeiro de 1986 e 1987. Os animais foram pescados com auxílio de tarrafas e, vez ou outra, apanhados manualmente. Uma vez coletados, os animais foram acondicionados em caixas de isopor contendo água dos locais de coleta. A aeração foi mantida com aeradores à pilha. O transporte até Curitiba, foi efetuado por via terrestre, por percurso de aproximadamente 1300 km, com cerca de 70% dos peixes sobrevivendo a essa etapa.

Para o período de aclimação às condições de laboratório e manutenção de estoque, os peixes, em número de 250, foram distribuídos em grupos de 10 e transferidos para aquários com capacidade para 250 litros, contendo água previamente purificada por filtração em filtros de celulose e de celulose com carvão ativado, respectivamente.

Em cada aquário, foi instalado um filtro biológico de placa, mantido no fundo sob camadas de cascalho, e dois filtros internos contendo saibro de mármore, carvão ativado e fibra de poliéster (Fig. 4). O pH da água permaneceu estável  $7,4 \pm 2$  e a temperatura mantida a  $28^{\circ} \text{C} \pm 1$ , por efeito de um sistema termostato - aquecedor.

A iluminação foi fornecida por lâmpadas de 25 W, luz dia, sendo o fotoperíodo de 10/14 horas dia/noite.

A alimentação foi fornecida duas vezes ao dia, às 10:00 e às 16:00 h, constando de alimento vivo, *Pheretima* sp e de ração dissolvida em gelatina neutra incolor, para facilitar a sua ingestão. A composição básica da ração (Nuvital) fornecida aos peixes é de milho gelatinizado, farinha de torta de soja, farinha de peixe, sub-produtos do trigo, fermento de cervejaria dessecado, ortofosfato bicálcico, carbonato de cálcio e de magnésio, sal comum, suplementos e aditivos.

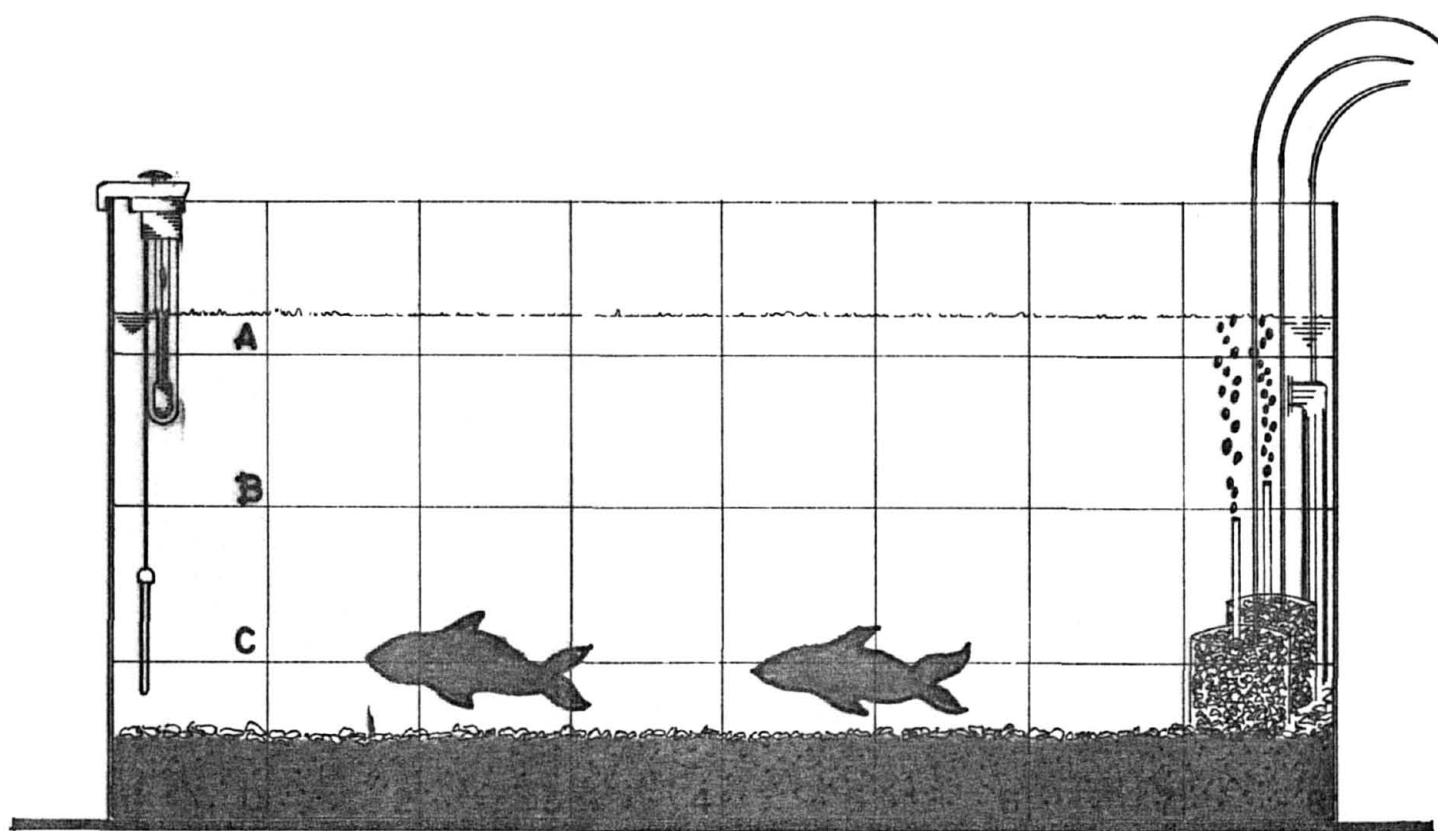


Figura 4. Montagem do aquário para manutenção e para estudos comportamentais do Callichthys callichthys. Em cada aquário, foi instalado um filtro biológico de placa, mantido no fundo sob camadas de cascalho, dois filtros internos e um sistema termostato-aquecedor para manter a temperatura. A face frontal do aquário foi quadriculada para permitir medidas da motilidade dos peixes.

## 2.2. Administração do Folídol 600

Peixes C. callichthys foram intoxicados com Folídol 600, um produto comercial da marca Bayer, contendo 600 g/L do ingrediente ativo Paration metílico (o-o-Dimetil o-p-nitrofenilfosforotioato; ácido fosforotióico o-o-dimetil o-p-nitrofenilester; o,o-dimetil o-p-nitrofenil tiofosfato; dimetil paration; PM 263,23). Essa substância é cristalizada a partir do metanol a frio e possui ponto de fusão de 37-38°C, D = 1,5367. A sua solubilidade em água é de 50 ppm. É solúvel na maior parte dos solventes orgânicos. A densidade do produto formulado Folídol 600 é de 1,116 (The MERCK INDEX, 1968).

É necessário ressaltar que a Bayer do Brasil negou-se a fornecer a informação sobre a exata composição do produto comercial Folídol 600. Entretanto, como o interesse do presente trabalho era o estudo dos efeitos da intoxicação pelo composto organofosforado formulado, esse problema pode ser superado.

Dada a pequena solubilidade do Folídol 600 em água, e tendo em conta a sua lipossolubilidade, foi utilizado como diluente, para sua administração no tamboatã, o óleo de milho comercial (Mazola). Óleo de milho já foi empregado por BENKE & MURPHY (1974) para experimentos toxicológicos em peixes e camundongos, com Paration metílico. Para tanto, o óleo de milho foi autoclavado 30 minutos a 121°C e utilizado, dessa forma, para preparar as soluções de Folídol 600 (Tab. 1) que foram administradas em peixes e, ainda, para administração nos animais controles que receberam óleo de milho sem Folídol 600.



TABELA 1

RELAÇÃO DOSE/ANIMAL DE PARATION METILICO (PRINCIPIO ATIVO DO FOLIDOL 600) ADMINISTRADO.

FOLIDOL 600 (mg/kg)	QUANTIDADE DE PARATION METILICO INJETADA (mg/kg) *
250	135
500	270
1000	540
2000	1080

\* Calculada a partir da concentração do Paration metílico (600 g/l) no produto comercial Folidol 600 com densidade : 1,116.

O Folidol 600 dissolvido na proporção de 1:10 (1 ml de Folidol 600 e 9 ml de óleo de milho) em óleo de milho, foi injetado com seringa hipodérmica do tipo de insulina, na cavidade celomática dos peixes. Para tanto, cada peixe foi retirado do aquário com puçá, pesado e, então, envolto em pano apropriado e contido manualmente, expondo-se-lhe o ventre para administração do Folidol 600 ou do óleo de milho. Para injetar essas substâncias na cavidade celomática, a agulha foi aplicada em um ponto anatômico localizado logo acima do poro genital (Fig. 5). Volumes diferentes da solução de Folidol 600 foram injetados em cada peixe, na dependência do seu peso e da quantidade de Paration metílico a ser administrada.

### 2.2.1. Determinação da dose subletal do Folidol 600

A determinação da TL50 (TLm) ou limite de tolerância média do C. callichthys para o Folidol 600, foi feita através de um bioensaio estático, isto é, na ausência de fluxo contínuo da água com o tóxico (SPRAGUE, 1973). Para tanto, cada lote de 15 peixes foi injetado com doses que variaram de 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg de peso do Folidol 600, cuja correspondência, em princípio ativo, está mostrada na Tab. 1. Foi considerada como subletal, a dose de 500 mg/kg que desencadeava sintomatologia comprovável pela análise comportamental do animal sem, contudo, provocar a sua morte.

Os animais controle, que receberam apenas óleo de milho, foram mantidos em aquários separados.

### 2.3. Metodologia

Para execução dos experimentos programados para o presente estudo, foram mantidas estáveis as condições ambientais nos aquários e no laboratório de modo a eliminar, tanto quanto possível, a interferência de fatores que pudessem modificar as respostas dos animais à ação do organofosforado.

Para a realização desse bioensaio, três aspectos principais foram estudados: as modificações comportamentais dos peixes submetidos à ação do Folidol 600, em comparação com os animais do grupo controle aos quais foi administrado somente óleo de milho; o comportamento da colinesterase plasmática ao longo do

processo de intoxicação dos peixes e o estudo dos aspectos histológicos do rim e do fígado, a fim de controlar possíveis alterações morfológicas desses animais por ação do inseticida ou, possivelmente, dos demais componentes, não revelados, que entram na composição do Folidol 600.



Figura 5. Técnica para administração do Folidol 600 em Callichthys callichthys. O peixe é contido manualmente em uma toalha umedecida, enquanto que a aplicação do Folidol 600 ou óleo de milho é procedida logo acima do poro genital, na cavidade celomática.

### 2.3.1. Análise do comportamento

#### 2.3.1.1. Comportamento normal

Visando estudar o comportamento normal do tamboatã, foram observados 32 peixes contidos, 4 a 4, em 8 aquários experimentais, com 128 litros de capacidade cada um, nas mesmas condições em que já se encontravam aclimatados (2.1.2).

As faces dos aquários foram revestidas com papel verde, com exceção da frontal cuja superfície foi dividida em uma série de pequenos quadrados, com 10 cm de lado cada um, que se prestaram para avaliar a motilidade dos peixes nas condições normais (FANTA, Comunicação pessoal). A frente de todas as faces frontais foi colocado um anteparo munido de um orifício a fim de serem observados os movimentos e o comportamento dos animais sem que fossem molestados ou estimulados. (Fig. 6).

No período de iluminação (dia), as observações foram feitas de hora em hora, das 8:00 às 18:00 horas, com 10 minutos de duração.

Para observação do comportamento no período escuro (noite), os peixes foram submetidos à inversão dia-noite continuando com um fotoperíodo de 10/14 horas dia-noite, sendo que o período de luz se iniciou às 18:00 horas. Após um período de adaptação de 14 dias, iniciaram-se as observações de hora em hora, com 10 minutos de duração. Para a visualização dos peixes, havia uma lâmpada de bulbo de luz vermelha (FANTA, Comunicação pessoal) de 25 W sobre cada aquário.

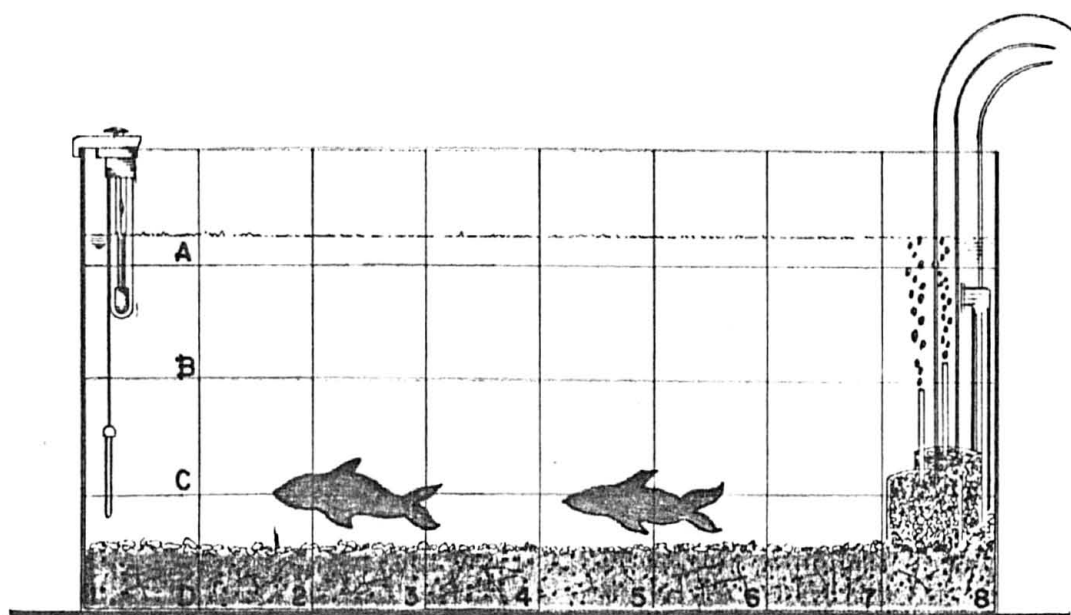
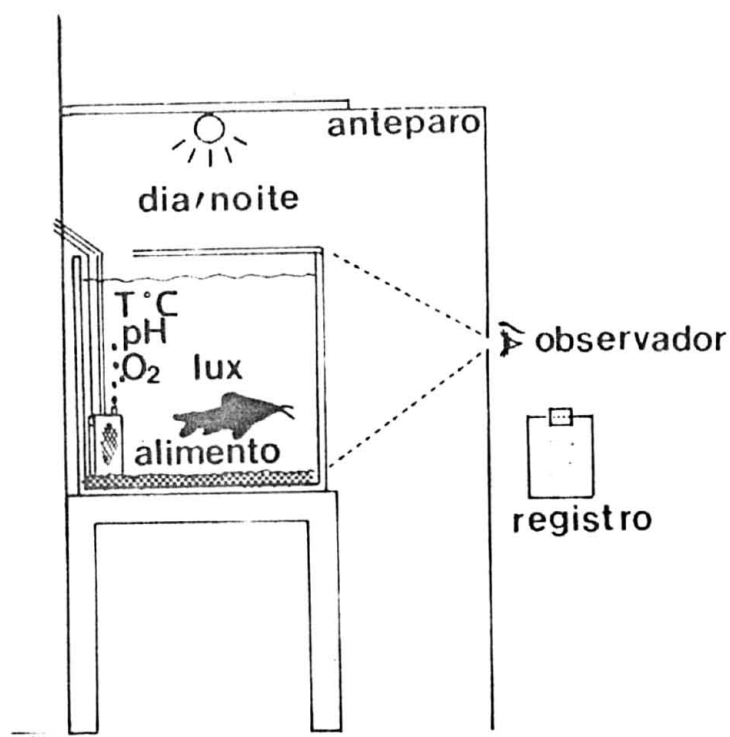


Figura 6. Detalhes do processo utilizado para estudos comportamentais com Callichthys callichthys, em situação normal e intoxicado com Folidol 600. Na parte superior, vista lateral do aquário munido de anteparo, que permite ao observador estudar o comportamento dos animais sem que sejam estimulados ou molestados. Na parte inferior, vista frontal do aquário quadrado, para permitir medidas da motilidade dos peixes.

A nomenclatura comportamental empregada no presente trabalho foi adaptada de BAERENDS (1971). O etograma, para a espécie, foi formulado com os seguintes parâmetros comportamentais: alimentação, presença de fezes, respiração, motilidade, repouso, coloração, procura da alimento e parâmetros que normalmente não são comuns no comportamento da espécie como: agressividade, coceira e salto. Estão também incluídos outros dados sobre as condutas de observação (Figura 7).

Os resultados numéricos foram transferidos para uma planilha e os gráficos obtidos através do programa Lotus 1-2-3 utilizando-se microcomputador Solution 16.

#### 2.3.1.2. Comportamento de peixes intoxicados

Para estudo das alterações comportamentais, 68 peixes foram transferidos, 4 a 4, para 17 aquários, com 128 litros de capacidade cada um e nas mesmas condições para as quais já se encontravam aclimatados (2.1.2).

Dos animais, 32 que já haviam sido submetidos aos estudos de comportamento normal (2.3.1.1), foram pesados e inoculados, na cavidade celomática, com Folidol 600 diluído 1:10 em óleo de milho na dose de 500 mg/kg de peso vivo, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico. Peixes, em número de 24, foram pesados e inoculados com óleo de milho, e os restantes, em número de 12, passaram apenas pelo manejo da pesagem e da inoculação com a finalidade de serem submetidos ao mesmo "stress" que os outros para o controle normal da espécie.

## FICHA DE OBSERVAÇÃO

DATA \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

HORA DA ALIMENTACAO. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

TEMPERATURA \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

PM. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

IFITOPELTUDO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Mo. PEIXES. \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Mo. AGUAIRTO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

PARA POSICAO SEGUIR ESQUENA

F = FRENTE

A = ATRAS

H = HORIZONTAL

V = VERTICAL

A								
B								
C								
D								
	1	2	3	4	5	6	7	8

[illegible]

Figura 7. Etograma do Callichthys callichthys

As condições dos aquários e do laboratório foram as mesmas utilizadas e descritas no item 2.3.1.1.

Os peixes foram observados durante o período de luz (dia), de hora em hora, tendo início às 8:00 horas, sendo a relação dia-noite de 10/14 horas. Durante o período do escuro (noite), lâmpadas vermelhas de 25 W permaneceram acesas, apenas para observações às 7:00 e às 18:00 horas.

A dose inoculada de Folidol 600, de 500 mg/kg de peso vivo, forneceu resultados da variação comportamental dos peixes desde o "tempo zero" até 120 horas após a administração da droga, por se tratar de um experimento agudo (SPRAGUE, 1973).

Certas alterações comportamentais foram filmadas para uma avaliação mais detalhada, com filmadora de vídeo Panasonic. Os resultados foram analisados e os gráficos obtidos por computador como já citados no item 2.3.1.1.

## 2.3.2. Métodos analíticos

### 2.3.2.1. Preparo das amostras de plasma

Plasma, para medidas da atividade da colinesterase, foi obtido a partir de sangue heparinizado. Para tanto, as paredes de seringas descartáveis de 2 ml munidas de agulhas 25x7, utilizada para punção cardíaca, foram umedecidas com Lique mine (Roche), um preparado de heparina que contém 5.000 U.I./ml, correspondendo a cerca de 50 mg de heparina.

Cada peixe, uma vez retirado da água, permaneceu contido na mão, envolto por uma toalha úmida e mantido com o



ventre voltado para cima, um pouco inclinado na vertical, posição na qual as nadadeiras peitorais permanecem abertas, deixando exposto o local da punção, ou seja, entre as nadadeiras peitorais (Fig. 8). De cada animal obteve-se cerca de 0,5 ml de sangue formando-se um "pool" com cada dois animais (1 ml de sangue) que foi a seguir centrifugado a 460 g durante 10 minutos. O sobrenadante límpido foi destinado para provas analíticas.



Figura 8. Técnica de punção cardíaca do Callichthys callichthys. O animal é contido manualmente, envolto em toalha úmida um pouco inclinado na vertical, posição em que as nadadeiras peitorais permanecem abertas, deixando exposto o local da punção.

Foram colhidas amostras do grupo controle de peixes normais e administrados com óleo de milho, e de peixes do grupo experimental, administrados com Folidol 600.

#### 2.3.2.1.1. Peixes normais

A amostragem de peixes normais consistiu de punção cardíaca de 36 peixes puncionados em grupos de 3 a 3, em dias alternados, durante 30 dias.

#### 2.3.2.1.2. Peixes submetidos à ação do óleo de milho e do Folidol 600.

Coleta de sangue de peixes intoxicados ou tratados com óleo de milho foi procedida com o emprego da mesma técnica.

Para tanto, dois grupos de peixes foram estudados, sendo 32 intoxicados e 24 inoculados com óleo de milho. Todos esses animais foram submetidos a estudos de análise comportamental.

As punções cardíacas nesse grupo, foram efetuadas a partir de 4 horas até 120 horas após inoculação. Os animais, 4 a 4, em cada grupo e em cada tempo de punção cardíaca, foram utilizados para a obtenção de sangue e, a seguir, sacrificados para estudos histopatológicos. Os tempos de punção foram os seguintes: 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a administração do Folidol 600 ou do óleo de milho.

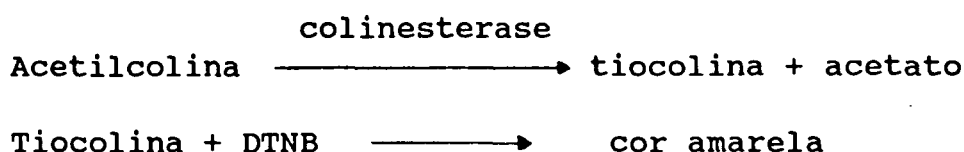
Devido aos resultados obtidos quanto aos níveis de colinesterase plasmática até 120 horas, foi importante repetir o

experimento apenas para análise bioquímica, com duração de 37 dias (888 horas) após a inoculação da droga. Foram utilizados 24 peixes, transferidos, 4 a 4, para 6 aquários. Desses, 4 aquários foram utilizados para os experimentos e 2 para controle de óleo de milho. As coletas foram feitas, primeiramente, antes da inoculação (tempo zero) e após a inoculação intracelomática da mesma dose de 500 mg/kg de Folidol 600 administrada no experimento anterior.

O sangue de oito peixes foi retirado, de aquários alternados, a cada horário estabelecido, tendo início 4 horas após a inoculação. Como foi utilizado um "pool" de sangue de dois animais, 4 amostras de peixes intoxicados e duas do grupo controle de óleo de milho por horário foram analisadas.

#### 2.3.2.2. Medida de atividade de colinesterase

Colinesterase plasmática foi medida de acordo com a técnica de ELLMAN et al (1961) e de DIETZ et al (1973) modificada, cujo princípio é o desenvolvimento da reação colorida que se desenvolve entre o DTNB (ácido 5,5-ditio-2-nitrobenzoico) e a tiocolina:



Como a colinesterase catalisa a hidrólise inespecífica de ésteres de colina, na técnica utilizada, em lugar da acetilcolina preconizada por ELLMAN et al (1961) e da



2 - Substrato, solução de iodeto de acetiltiocolina, 10,2 mM, contendo 2,95 mg por ml de água.

3 - Reagente de cor, DTNB, 0,423 m mol/litro. Dissolver 167 mg de DTNB por litro de tampão fosfato, pH 7,6.

Procedimento: Em cubeta retangular de 10 mm de passo de luz, pipetar 2 ml de solução DTNB em tampão fosfato pH 7,6; 0,5 ml da solução de iodeto de acetiltiocolina; e 50  $\mu$ l de plasma. A leitura da atividade enzimática foi seguida medindo-se o incremento da absorbância a 410 nm, a 37°C, em espectofotômetro Beckman DU com banho-maria circulante, desde o tempo zero até 15 minutos de reação.

#### 2.3.2.3. Medida de proteína

Proteína plasmática foi medida de acordo com o método de LOWRY et al (1961), usando o reagente fenólico de Folin-Ciocalteu. A leitura da cor desenvolvida foi feita em espectofotômetro Beckman DU a 660 nm. A curva padrão de proteína foi executada a partir de albumina sérica bovina, em concentração variando de 40 a 280  $\mu$ g.

#### 2.3.3. Análise morfológica

##### 2.3.3.1. Coleta de material para estudos histológicos.

Oito animais de cada vez, sendo quatro intoxicados e quatro controles, tratados com óleo de milho foram sacrificados,

por secção medular, seguida de decapitação após 4, 24, 48, 72, 96, e 120 horas a partir da inoculação da droga. Os peixes controle normais foram sacrificados ao final da experimentação.

Foi feita uma abertura longitudinal ao longo do ventre de cada animal, facilitando a exposição dos órgãos à penetração do líquido fixador (formol a 20% acrescentado de 5% de ácido fórmico) no qual permaneceram durante uma semana. As amostras de fígado e de rim foram obtidas pela retirada de fatias de 0,5 cm de espessura das regiões anterior, média e posterior de cada animal. Cada região continha, respectivamente, fígado e porção anterior, porção mediana e porção restante do rim (Fig. 9). Foi feita uma preparação total, que incluiu os outros tecidos presentes nas regiões consideradas.

Para a avaliação, foram consideradas e descritas as características do rim e do fígado, por serem pontos onde ocorrem lesões produzidas por agrotóxicos (MEDINA et al, 1988).

#### 2.3.3.2. Metodologia histológica

Todas as porções obtidas das regiões anterior, média e posterior do corpo do animal, após fixação, foram submetidas às técnicas de rotina histológica, para finalidade de diagnóstico dos eventuais efeitos morfológicos produzidos pelos organofosforados.

Parte das lâminas foi corada pela hematoxilina Delafield/eosina (LILLIE, 1977). Outra parte, foi corada pelo P.A.S. (Ácido periódico de Schiff) (LILLIE, 1977), com utilização

da hematoxilina Delafield para coloração dos núcleos. Em algumas lâminas, empregou-se o método de Pearls (azul da Prússia) para identificação de pigmento fêrrico renal (PEARSE, 1953).

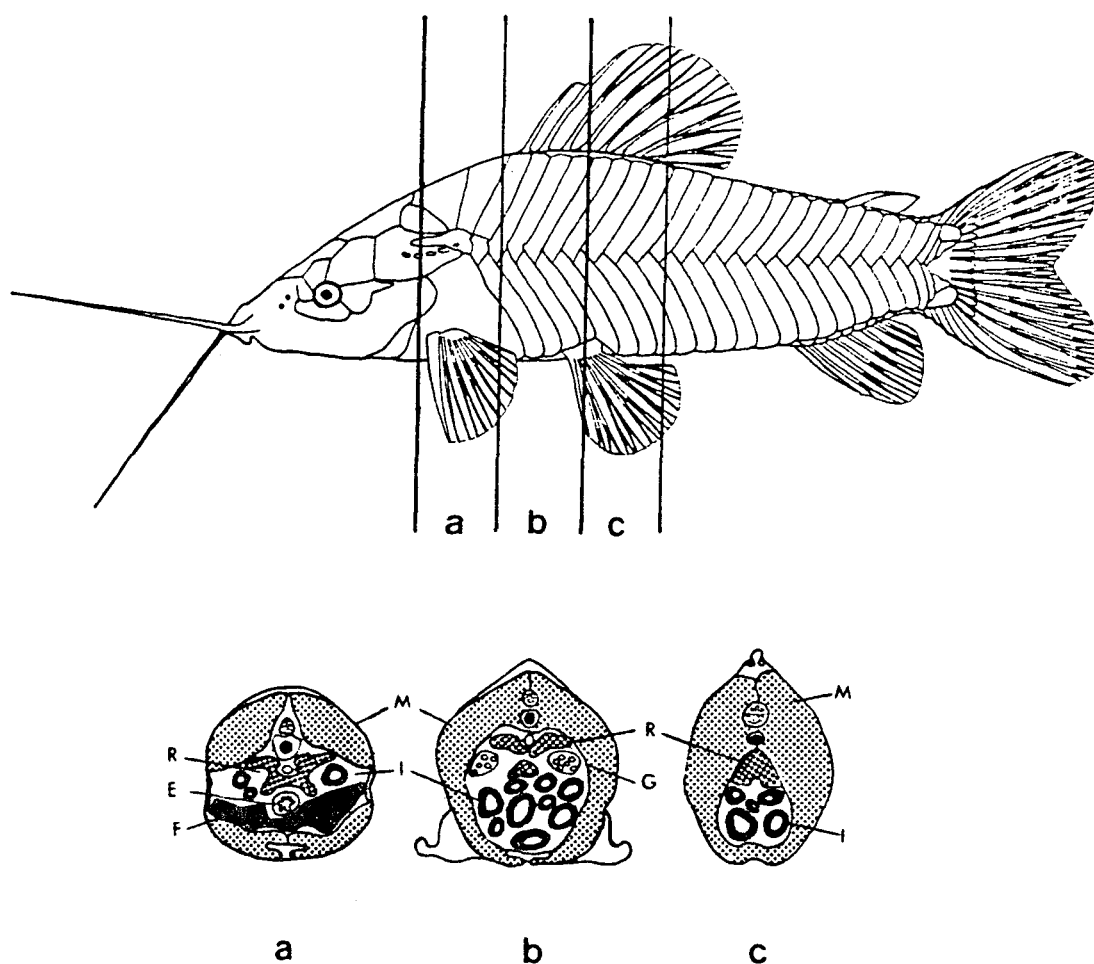


Figura 9. Planos de secções de *Callichthys callichthys* para estudos histopatológicos. a, região anterior, compreendendo a parte do corpo do peixe contida entre a cabeça, previamente seccionada e o terceiro par de placas ósseas; b, região média compreendendo a parte do corpo situada entre o terceiro e o sexto par de placas ósseas; c, região posterior compreendendo a parte do corpo situada entre o sexto e o décimo par de placas ósseas. Cada região mostrada foi subdividida em fatias e incluídas em parafina, submetidas às técnicas histológicas de rotina para análise de possíveis lesões do fígado e do rim. M, músculo; R, rim; I, intestino; F, fígado; E, estômago; G, gônada.

### III. RESULTADOS

#### 3.1. Determinação da dose subletal do Folidol 600 para Callichthys callichthys

Folidol 600, administrado em Callichthys callichthys na dose de 2000 mg/kg, correspondendo a 1080 mg de Paration metílico, ocasionou a morte de todos os animais após 40 minutos de inoculação. Os animais do grupo controle, que receberam o diluente (óleo de milho), permaneceram dentro dos padrões normais.

A sintomatologia observada foi primeiramente agitação, perda de equilíbrio, representada por natação lateral, algumas vezes posicionados de ventre para cima com incoordenação de movimentos para retornar à posição normal. Apresentaram alguns trismas de nadadeiras peitorais, coloração esbranquiçada das nadadeiras e da parte ventral do corpo. A respiração mostrou-se superficial, com maior amplitude dos opérculos. Os animais não reagiram à presença de alimento. Após o período de agitação permaneceram no fundo do aquário, com movimentos descoordenados na tentativa de deslocamento, com certa ansiedade sem conseguirem locomover-se, permanecendo, assim, até o estágio de morte.

A dose de 1000 mg/kg de Folidol 600, correspondente a 540 mg/kg de Paration metílico, ocasionou a morte de todos os animais, no fim de 48 horas da administração da droga, enquanto que os controles, que receberam óleo de milho, permaneceram dentro dos padrões normais.



A sintomatologia observada foi a mesma descrita anteriormente para os animais que receberam 1075 mg/kg de Paration metílico, apenas com menor intensidade e com estágios de agitação e repouso mais prolongados. O período de agitação durou aproximadamente 24 horas, após o qual os animais permaneceram no fundo do aquário com incapacidade de locomoção ou letargia até a morte.

Na dose de 500 mg/kg de Folidol 600, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, os peixes não morreram no tempo de duração do experimento (120 horas), mas apresentaram alguns sintomas como perda de equilíbrio, respiração superficial com grande amplitude dos movimentos operculares, principalmente nas primeiras 48 horas. A maior parte do tempo (aproximadamente 90%) permaneceram no fundo do aquário, agrupados, não se alimentando e mostrando movimentos natatórios descoordenados. Os animais controles permaneceram dentro dos padrões normais. Em razão desse fato, a dose de 500 mg/kg de Folidol 600 foi escolhida para os experimentos de análise comportamental, morfológica e para os estudos de inibição de colinesterase plasmática mostrados no presente trabalho.

Na dose de 250 mg/kg de Folidol 600 correspondente a 135 mg/kg de Paration metílico, os peixes também não morreram no tempo de duração do experimento (120 horas). Alguns sintomas, como perda de equilíbrio, respiração superficial foram observadas mas com menor intensidade. Os controles permaneceram dentro dos padrões normais.

### 3.2. Comportamento normal de Callichthys callichthys

Não foi o objetivo do trabalho estudar o comportamento normal do C. callichthys, mas seu conhecimento é de suma importância para a compreensão dos sinais e sintomas da intoxicação pelo organofosforado.

O comportamento normal de C. callichthys caracterizou-se por uma natação (distância percorrida em cm durante 10 minutos de observação) mais elevada no período escuro (noite). Os peixes nadaram em média 200 cm durante 10 minutos de observação, ao passo que, no período de iluminação (dia), a média de natação foi de 100 cm durante 10 minutos de observação. O tempo de repouso expresso em porcentagem durante o período escuro foi baixo, já que repousaram aproximadamente 1% do tempo de observação, enquanto que no período de iluminação ocorreram picos elevados de repouso de aproximadamente 50%, alternados com períodos de motilidade. Essa motilidade foi devida à presença de alimento.

A Fig. 10 mostra os resultados obtidos quanto ao padrão comportamental de natação de Callichthys callichthys observado durante o dia sob estímulo alimentar.

Verifica-se, assim, que o tamboatá, no momento que recebe o alimento (10:00 horas) responde com incremento em sua atividade natatória, fazendo com que aumente a distância percorrida (cm). Passado o estímulo produzido pela alimentação, o tamboatá retorna à sua situação de repouso até que nova etapa de alimentação (16:00 horas), faz com que retome sua atividade

natatória mais intensa.

Entretanto, no momento em que recebe o estímulo luminoso (8:00 horas) o tamboatá também experimenta uma ampliação, não tão intensa, na sua atividade natatória voltando em seguida à sua tendência natural, durante o dia, para o repouso, fato que justifica a diminuição dos seus movimentos natatórios registrados às 9:00 horas.

Quanto à velocidade de natação, expressa em cm/s, foi menor à noite apresentando em média 1,8 cm/s e durante o dia 3,0 cm/s. Isso implica em que, apesar do alto índice de motilidade à noite, a velocidade de natação é menor, enquanto que de dia, o pouco que nadam o fazem com maior velocidade.

No que concerne à atividade respiratória do tamboatá (Fig. 11), verifica-se que há uma correspondência entre o estímulo produzido pela alimentação e o número de batimentos operculares que experimenta, com decréscimo constante, mas menos pronunciado do que do movimento natatório, no período que intermedeia os dois picos produzidos às 10:00 e às 16:00 horas, respectivamente, em razão do fornecimento de alimento.

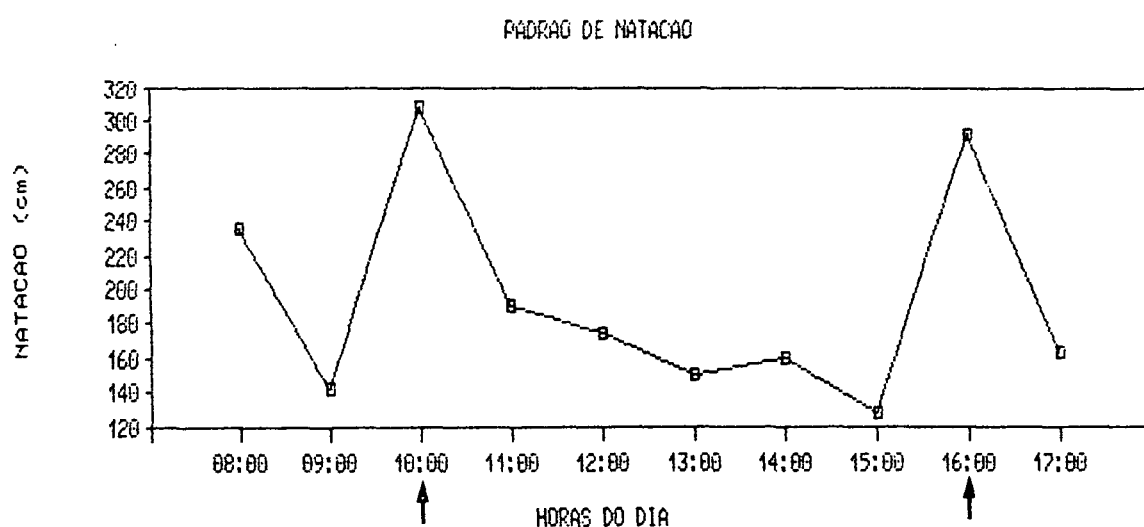


Figura 10. Perfil comportamental de Callichthys callichthys sobre o estímulo da alimentação. Os valores indicados se referem à atividade de natação medida durante o período de iluminação (8:00 - 17:00 horas). Os picos de natação aparecem às 10:00 e às 16:00 horas, correspondendo à reação dos animais frente à alimentação e as 8:00 horas ao início do ciclo luminoso. Os valores indicados se referem à média de 32 animais e a natação está expressa em centímetros, indicando a distância percorrida em 10 minutos de observação.



Figura 11. Perfil comportamental da frequência respiratória de Callichthys callichthys. Os valores indicados se referem à frequência respiratória durante o período de iluminação (8:00 - 17:00 horas). Aumento na frequência respiratória é observado nos horários de alimentação e no início do ciclo luminoso (8:00 horas). Os valores indicados se referem à média de 32 animais e a frequência respiratória está expressa em batimentos operculares/minuto.

### 3.3. Comportamento dos peixes intoxicados

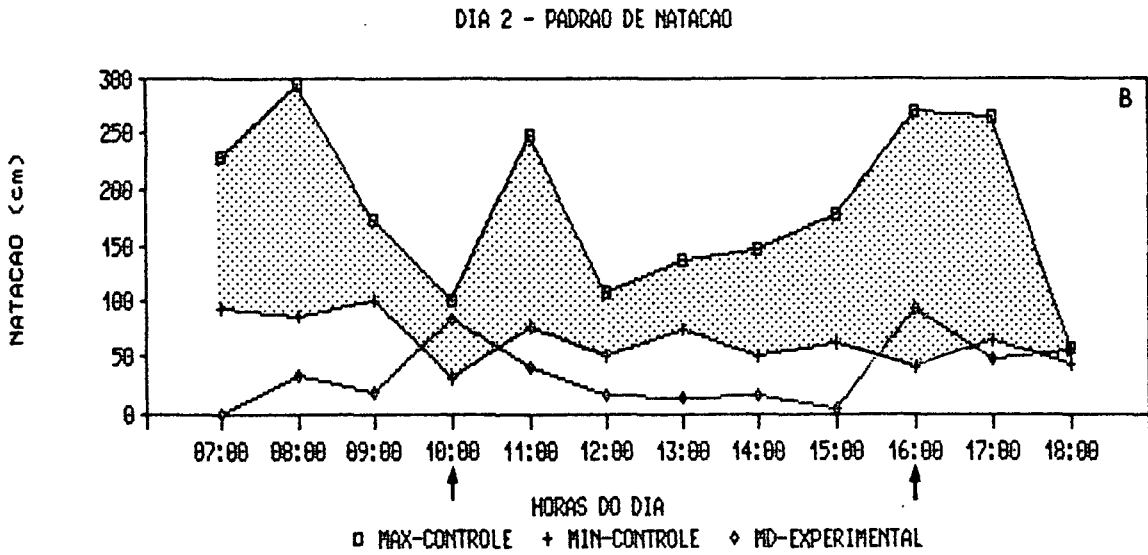
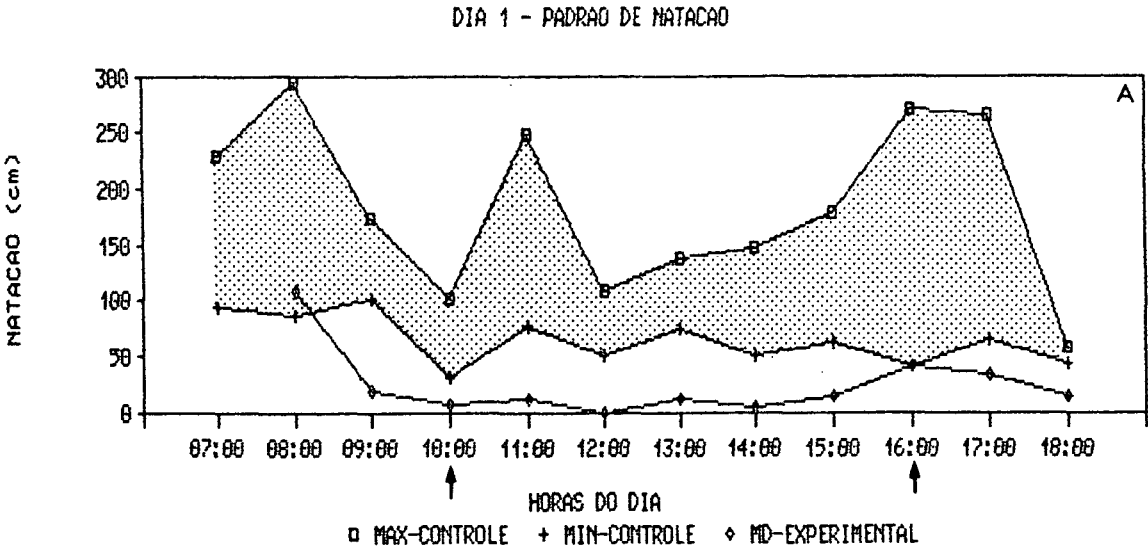
#### 3.3.1. Efeito do Folidol 600 no padrão de natação de Callichthys callichthys

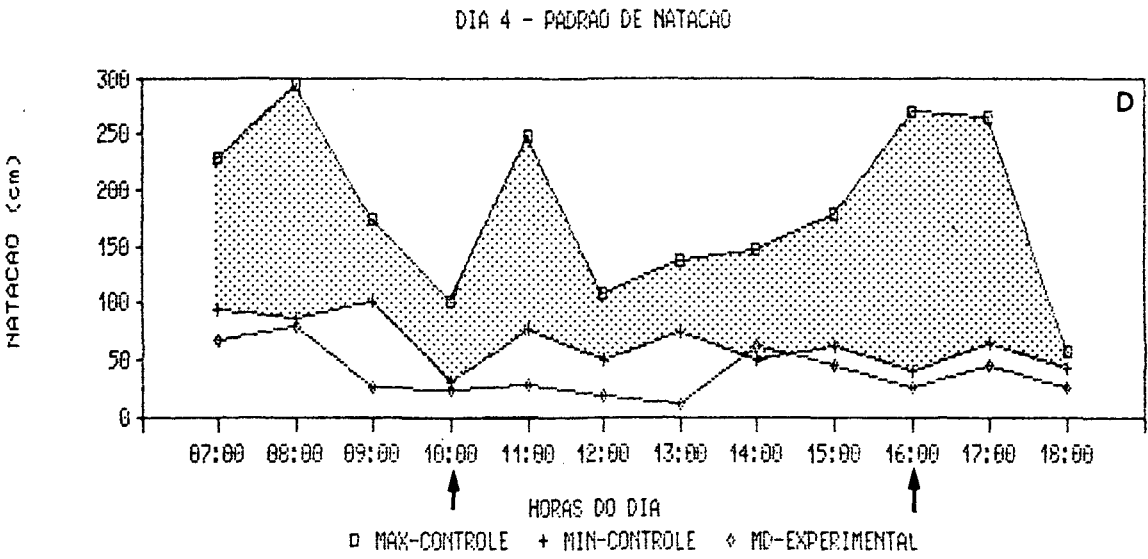
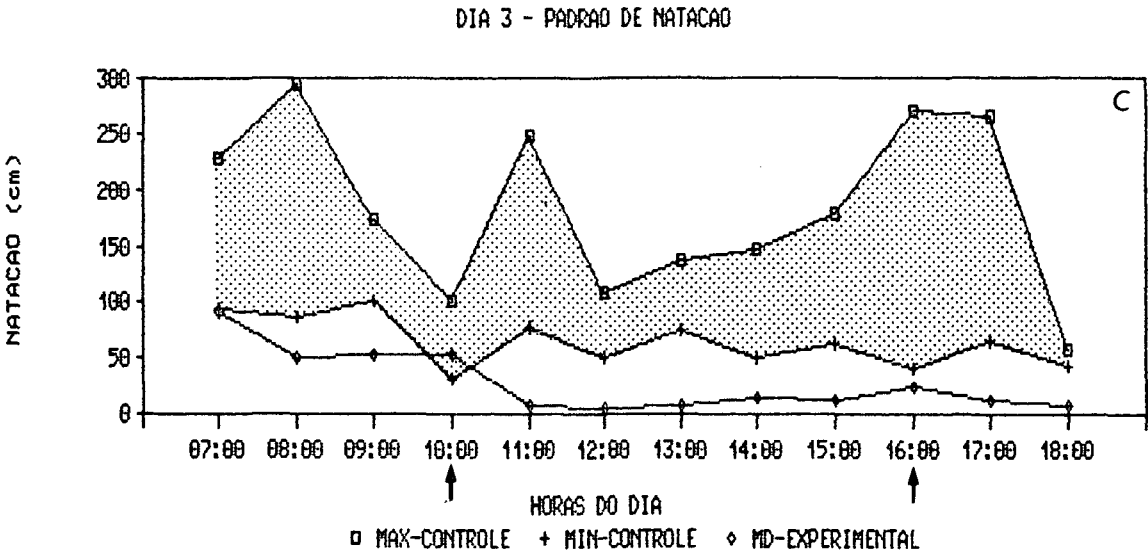
O efeito exercido pelo Folidol 600, na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre a atividade de natação do Callichthys callichthys, foi analisado. As Figs. 12A a 12E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados no período de

iluminação, isto é, de 8:00 às 18:00 horas, a partir da administração do Folidol 600 (tempo "zero"). Foram feitas observações às 7:00 e às 18:00 horas, no período de escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

Verifica-se, pelos resultados obtidos, que os peixes que receberam a droga apresentaram um padrão de natação abaixo dos valores mínimos encontrados para os controles normais. Observa-se que a partir de 24 horas após a administração da droga, os animais começaram a reagir ao estímulo alimentar. Quando o alimento foi fornecido, aqueles que vinham se mantendo em repouso, agrupados, executaram movimentos descontínuos de natação com descoordenação das nadadeiras, sem tomarem direção definida, e sem chegarem a ingerir alimento, voltando logo à posição inicial e ao repouso.

No 5º dia, 96 horas após a administração da droga, observa-se que a curva tende a atingir os valores mínimos do padrão normal, o que revela um aumento na motilidade dos peixes. Entretanto, os movimentos e a postura de natação continuaram alterados.







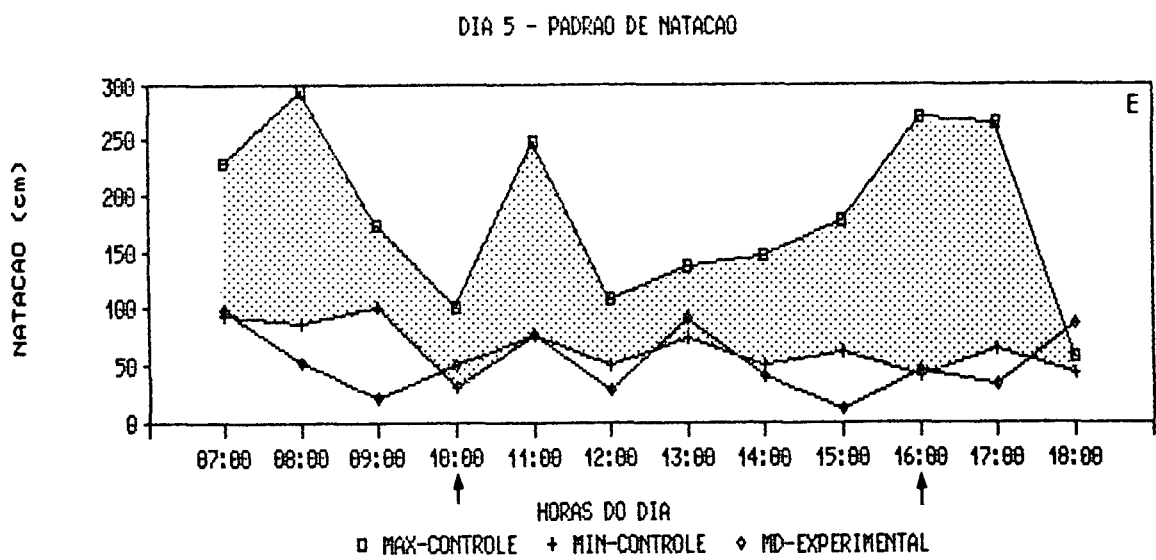
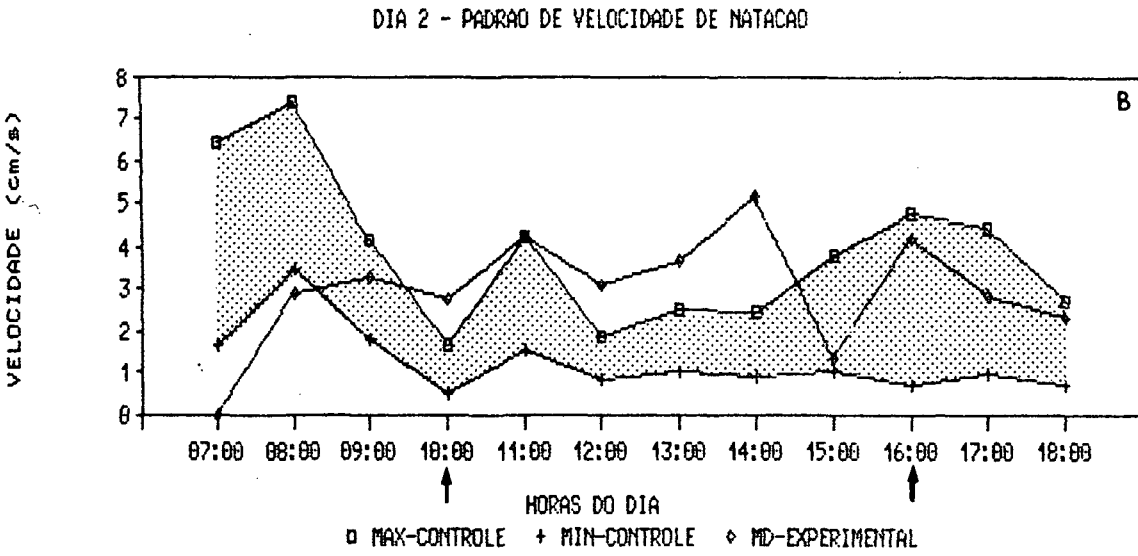
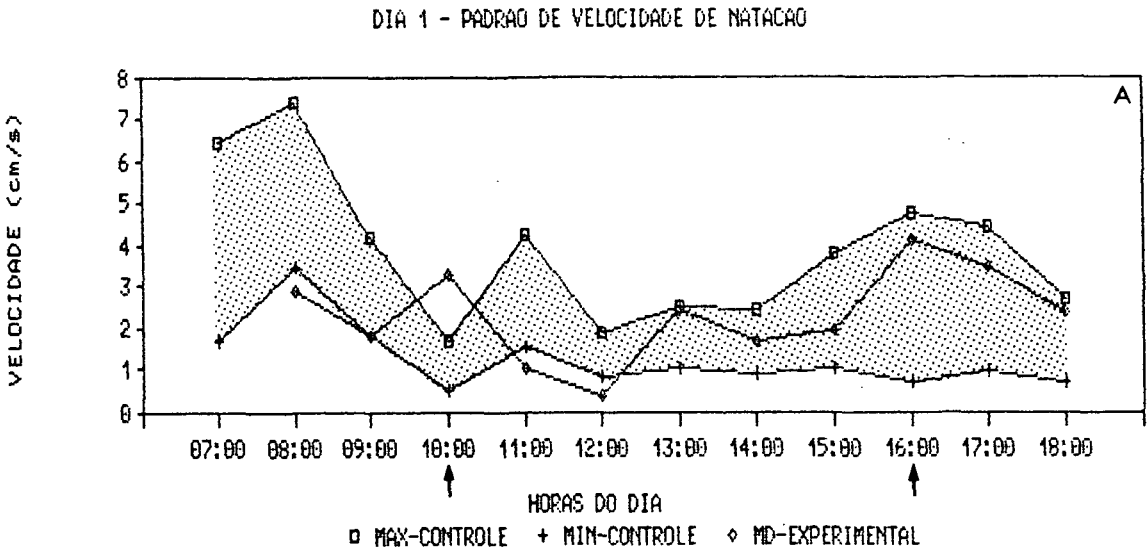


Figura 12. Efeito do Folidol 600 no padrão de natação de Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de natação normal. A curva (♦ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de natação do 2º dia; C, padrão de natação do 3º dia; D, padrão de natação do 4º dia; E, padrão de natação do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). A natação dos peixes está expressa em centímetros, indicando a distância percorrida em 10 minutos de observação.

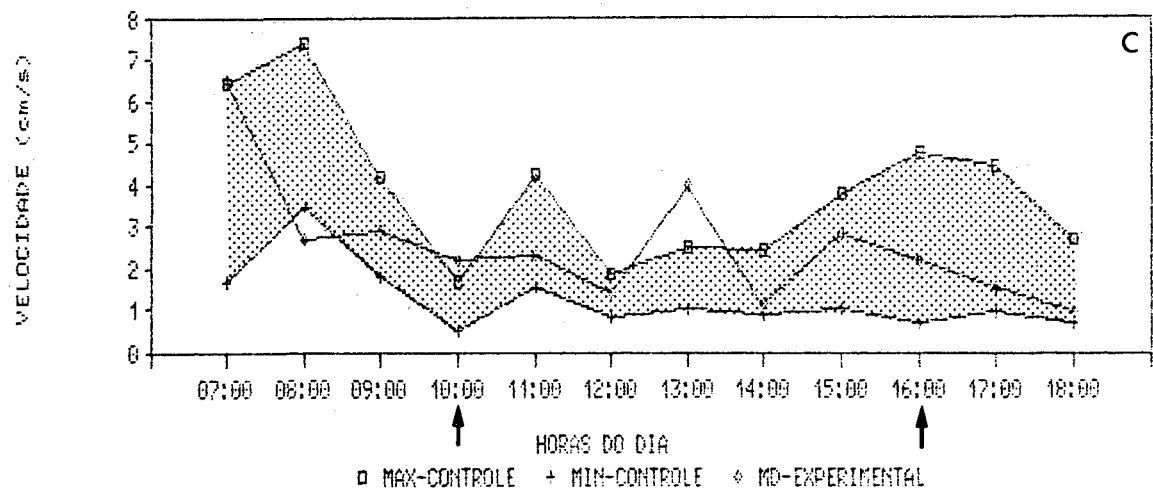
### 3.3.2. Efeito do Folídol 600 sobre o padrão de velocidade de natação do Callichthys callichthys

O efeito exercido pelo Folídol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre a velocidade de natação do Callichthys callichthys, foi analisada. As Figs. 13A a 13E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados a partir da administração da substância (tempo "zero") no período de iluminação (8:00 às 18:00 horas). Foram feitas observações às 7:00 e às 18:00 horas, no período escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

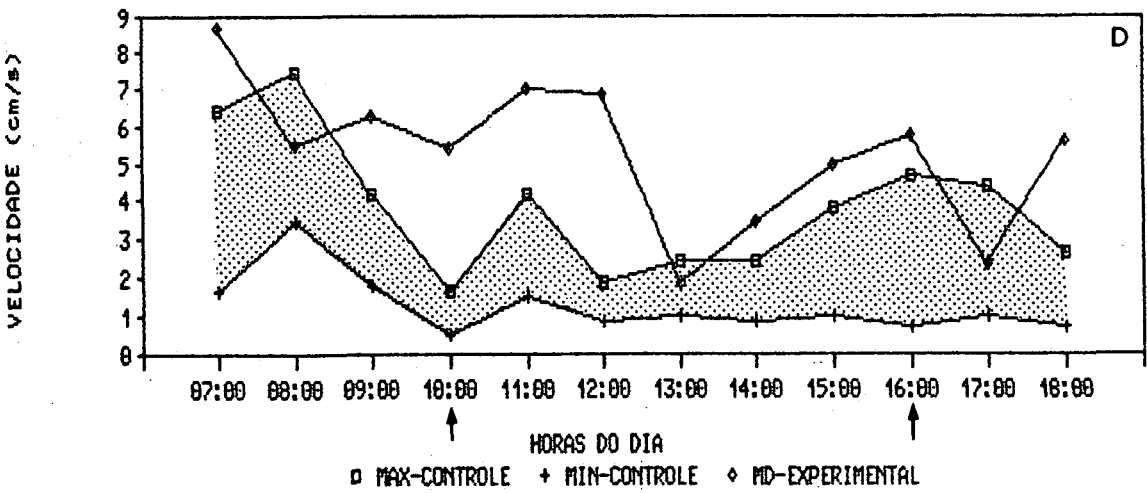
Verifica-se, pelos resultados obtidos, que os peixes intoxicados com Folídol 600 apresentaram velocidade de natação, em alguns horários do dia, superior aos valores máximos encontrados para os controles. Apesar da natação se apresentar descontínua e descoordenada, os peixes nadaram rapidamente. Esse fato está demonstrado nas Figs. 12A a 12E, onde fica nítida a necessidade dos peixes retornarem à posição de repouso inicial, após períodos de natação.



DIA 3 - PADRAO DE VELOCIDADE DE NATACAO



DIA 4 - PADRAO DE VELOCIDADE DE NATACAO



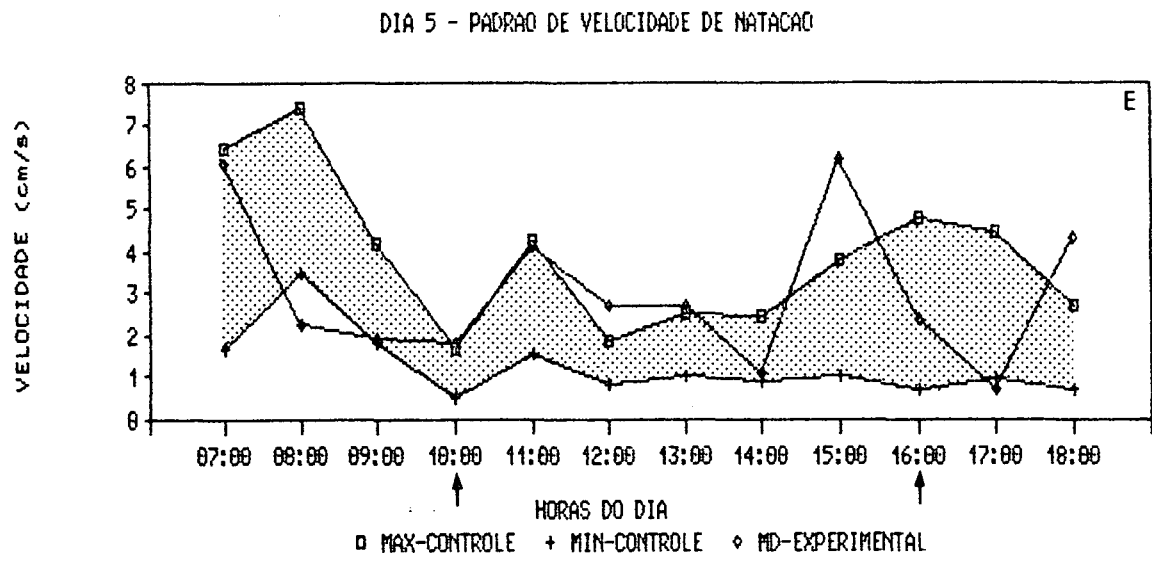


Figura 13. Efeito do Folidol 600 sobre o padrão de velocidade de natação de Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de velocidade de natação normal. A curva (♦ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de velocidade de natação do 2º dia; C, padrão de velocidade de natação do 3º dia; D, padrão de velocidade de natação do 4º dia; E, padrão de velocidade de natação do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). A velocidade de natação dos peixes está expressa em centímetros por segundo, indicando a distância percorrida por unidade de tempo.

3.3.3. Efeito do Folidol 600 sobre o tempo de repouso do Callichthys callichthys

O efeito exercido pelo Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre o tempo de repouso do Callichthys callichthys, foi analisado. As Figs. 15A a 15E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados a partir da administração da substância (tempo "zero") no período de iluminação (8:00 às 18:00 horas). Foram feitas observações as 7:00 e às 18:00 horas, no período escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

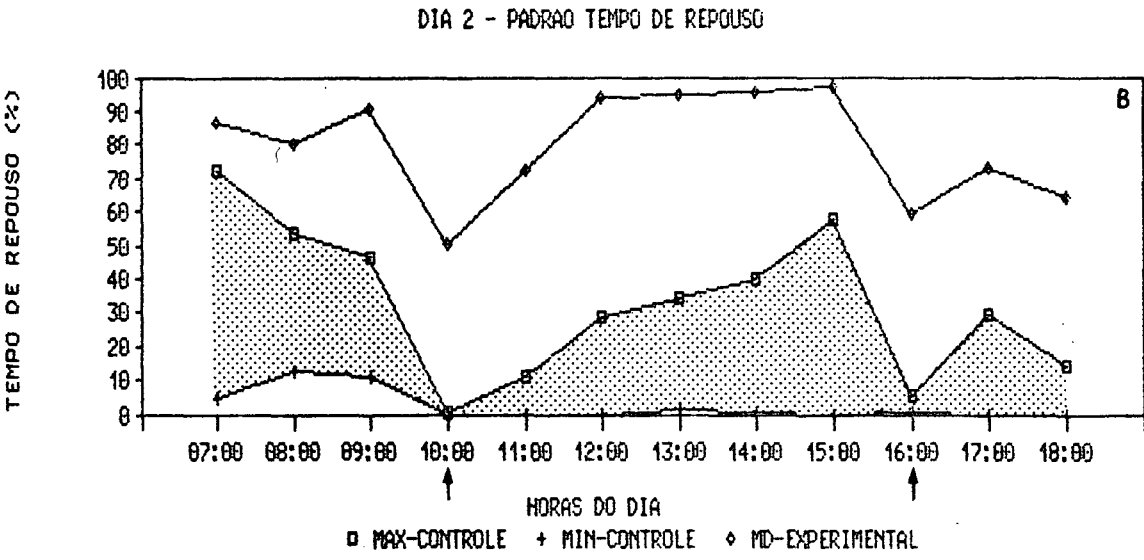
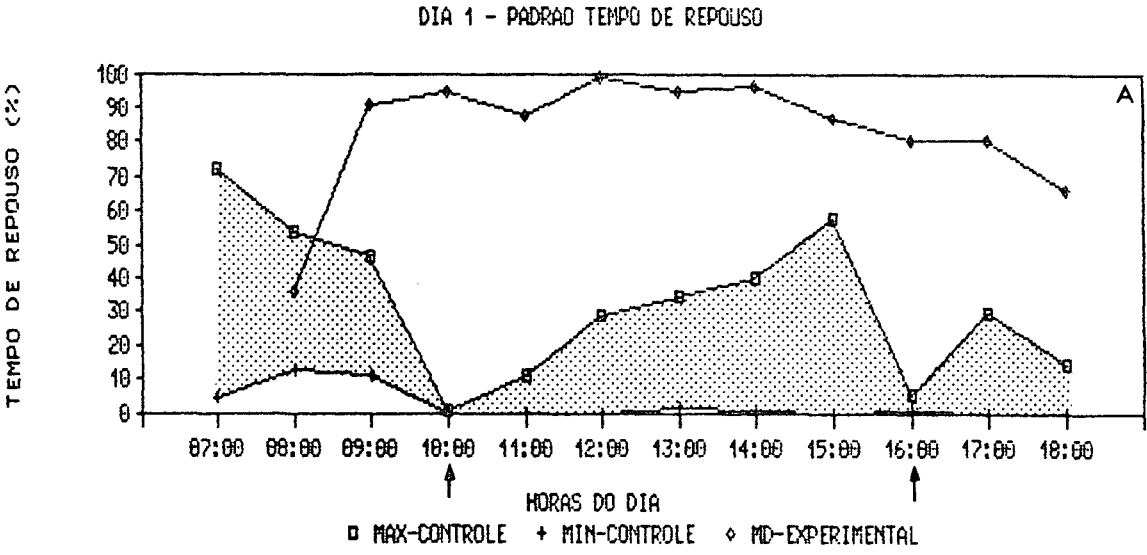
Verifica-se, pelos resultados obtidos, que os peixes intoxicados pelo Folidol 600 apresentaram tempo de repouso superior aos valores máximos encontrados para os controles. Nas primeiras 24 horas após a intoxicação, os peixes repousaram aproximadamente 90% do tempo de observação. Posteriormente (2º dia), reagiram ao estímulo alimentar, com movimentos descontínuos de natação, retornando logo a posição inicial de repouso. No 5º dia, após 96 horas, há nítida tendência de diminuição do tempo de repouso.

A postura de repouso tomada pelos animais intoxicados mostrou-se alterada em comparação com a normal, aqueles permanecendo agrupados no fundo e no canto do aquário, uns sobre os outros, mostrando, também, algumas vezes, dificuldade em se manterem totalmente apoiados no substrato. Lentamente, a parte

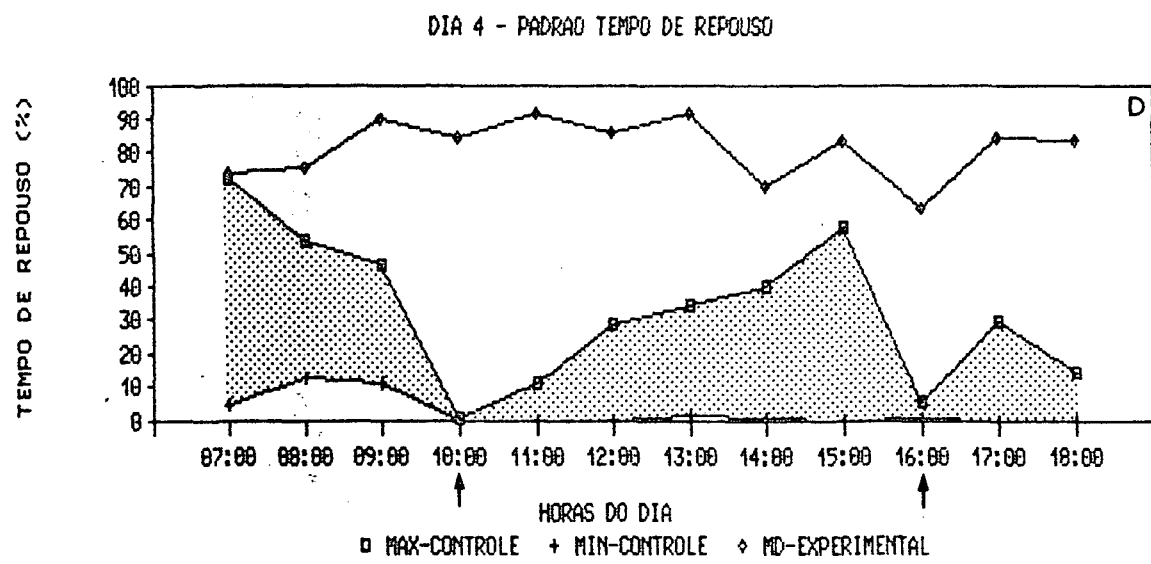
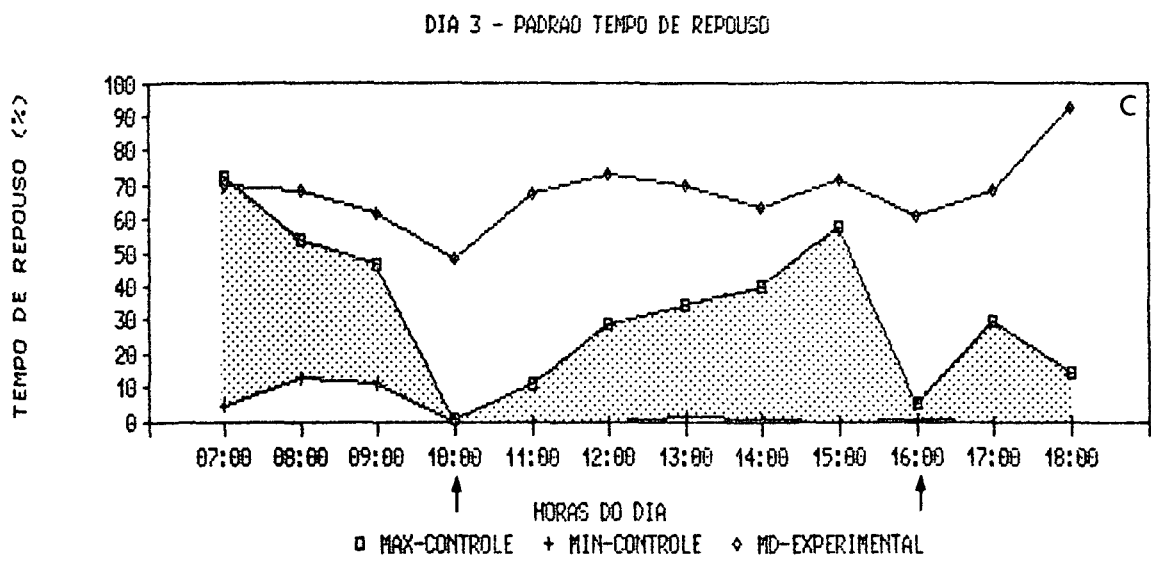
anterior do seu corpo flutuava, o que fazia os animais repousarem em ângulos de  $45^{\circ}$ , apoiados apenas na nadadeira caudal (Fig. 14).



Figura 14. Efeito do Folidol 600 sobre a postura de repouso do Callichthys callichthys intoxicado na dose de 500 mg/kg. O animal se apoia na nadadeira caudal mantendo o corpo em ângulo de  $45^{\circ}$  em razão da dificuldade de se manter apoiado no substrato. Foto obtida de vídeo, por congelamento da imagem.







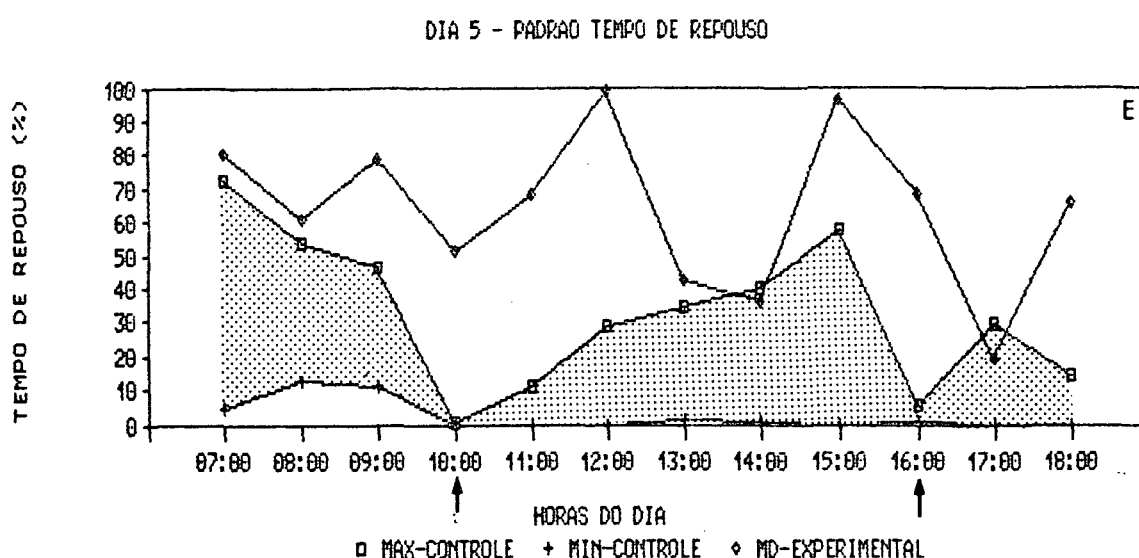


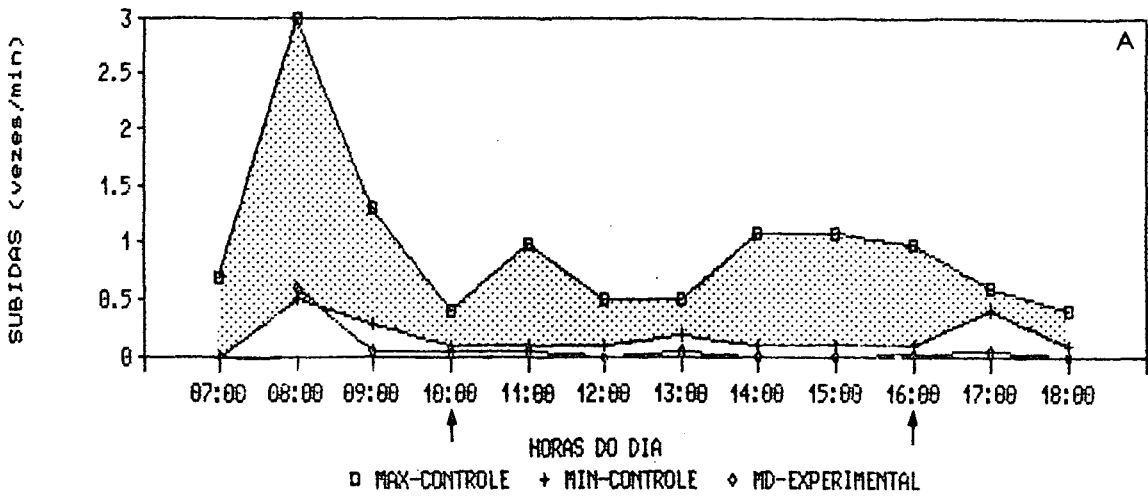
Figura 15. Efeito do Folidol 600 sobre o tempo de repouso do Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de velocidade de natação normal. A curva (♦ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de tempo de repouso do 2º dia; C, padrão de tempo de repouso do 3º dia; D, padrão de tempo de repouso do 4º dia; E, padrão de tempo de repouso do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). O tempo de repouso durante 10 minutos de observação, está expresso em porcentagem.

3.3.4. Efeito do Folidol 600 no padrão de subidas à superfície do Callichthys callichthys

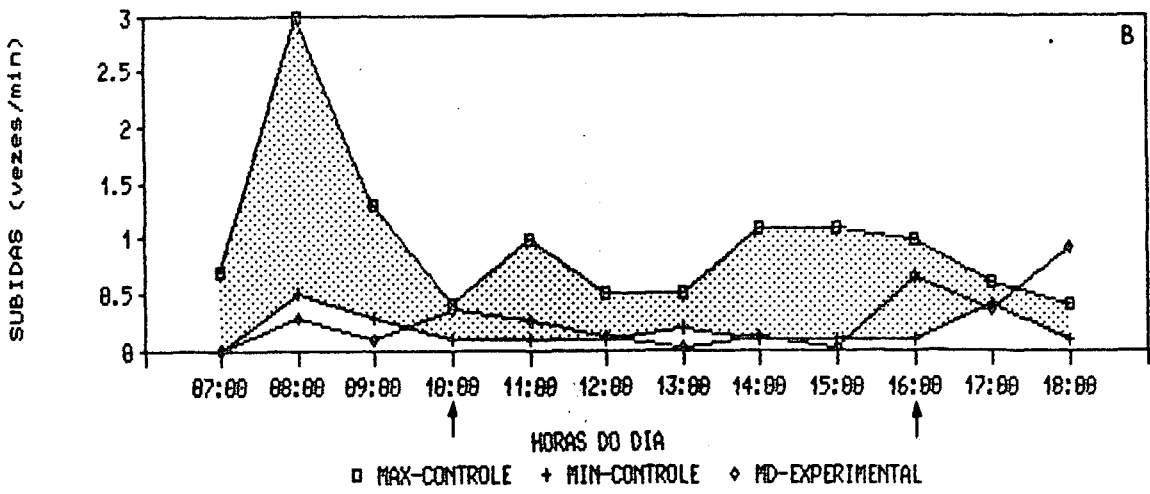
O efeito exercido pelo Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre o padrão de subidas à superfície do Callichthys callichthys, foi analisado. As Figs. 16A a 16E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados a partir da administração da substância (tempo "zero") no período de iluminação (8:00 às 18:00 horas). Foram feitas observações às 7:00 e às 18:00 horas, no período escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

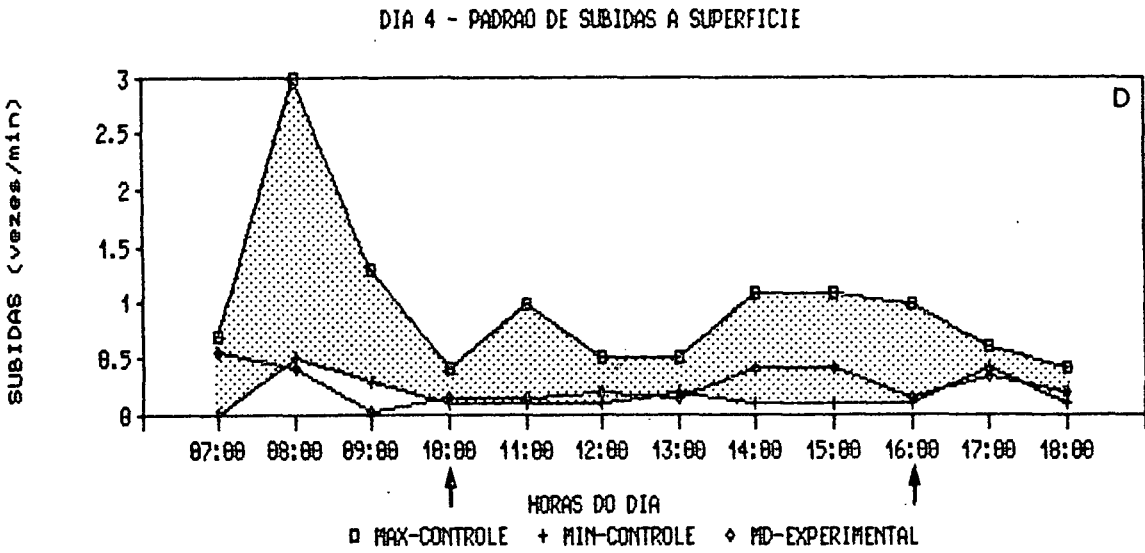
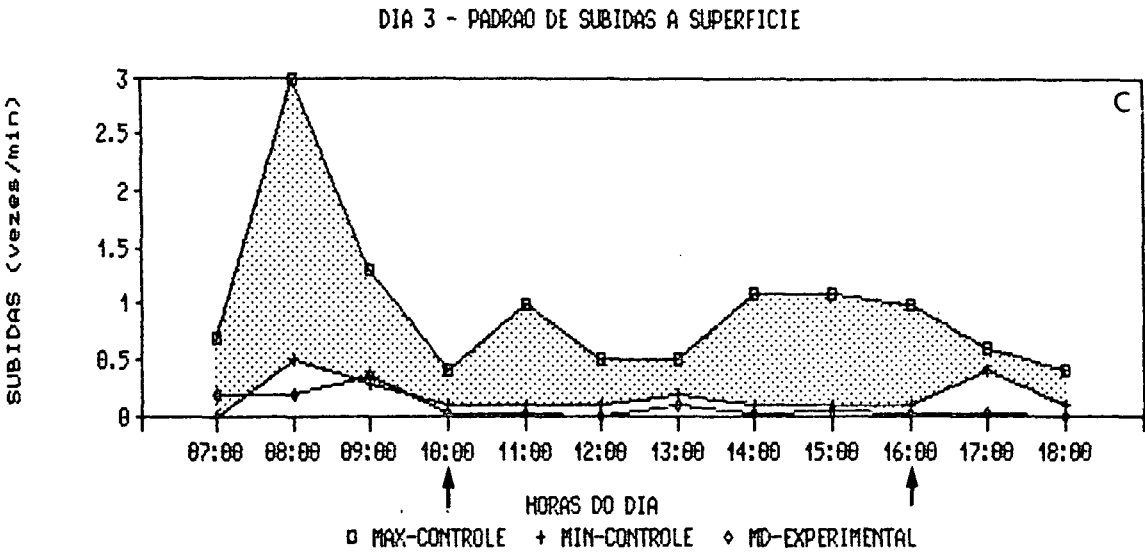
Observa-se, pelos resultados obtidos, que os peixes intoxicados, apresentaram frequência de subidas à superfície inferior ou próxima dos valores mínimos encontrados para os controles normais.

DIA 1 - PADRAO DE SUBIDAS A SUPERFICIE



DIA 2 - PADRAO DE SUBIDAS A SUPERFICIE





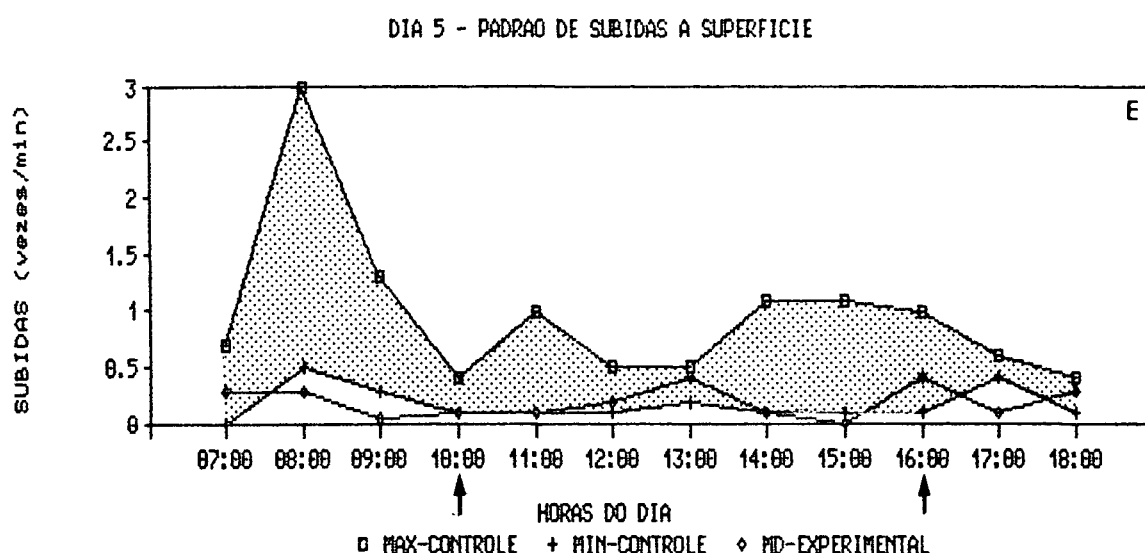
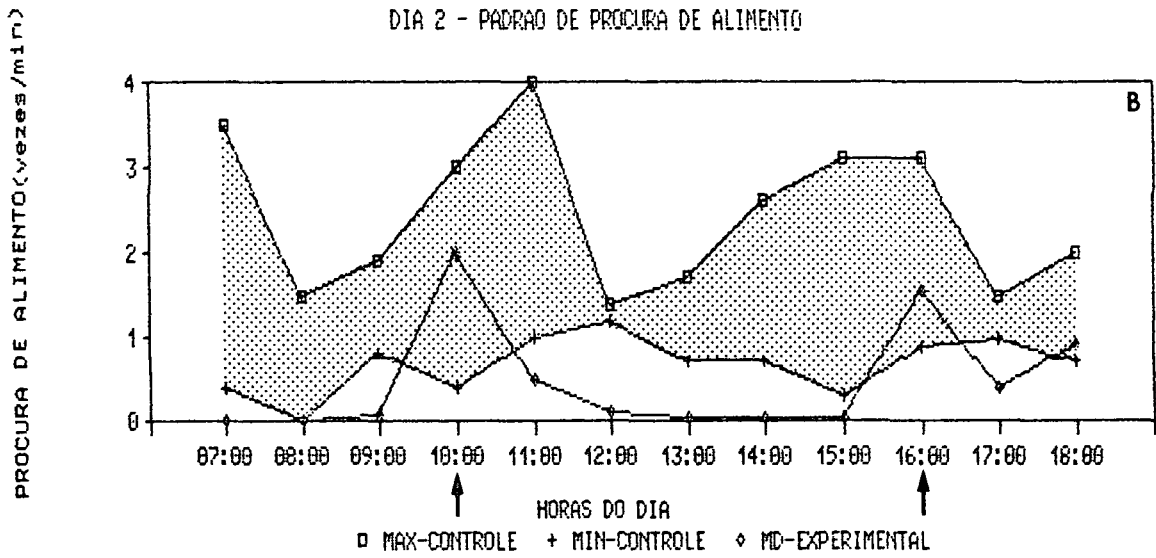
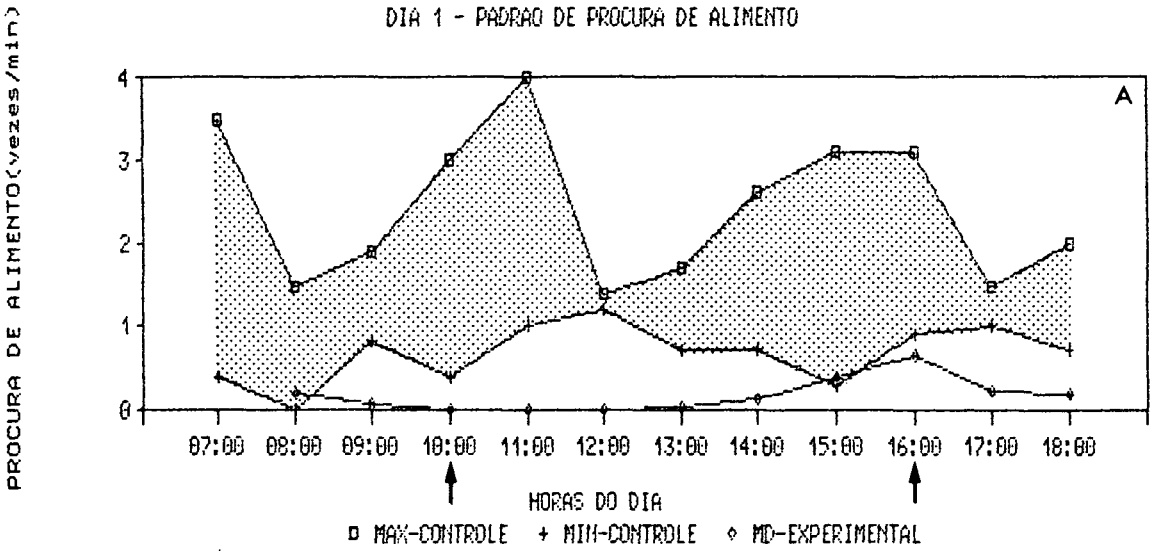


Figura 16. Efeito do Folidol 600 no padrão de subidas à superfície do Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de subidas à superfície. A curva (◇ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de subidas à superfície do 2º dia; C, padrão de subidas à superfície do 3º dia; D, padrão de subidas à superfície do 4º dia; E, padrão de subidas à superfície do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). A frequência de subidas à superfície está expressa em número de vezes por minuto.

### 3.3.5. Efeito do Folidol 600 no padrão de procura de alimento do Callichthys callichthys

O efeito exercido pelo Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre o padrão procura de alimento do Callichthys callichthys, foi analisado. As Figs. 17A a 17E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados a partir da administração da substância (tempo "zero") no período de iluminação (8:00 às 18:00 horas). Foram feitas observações as 7:00 e 18:00 horas, no período escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

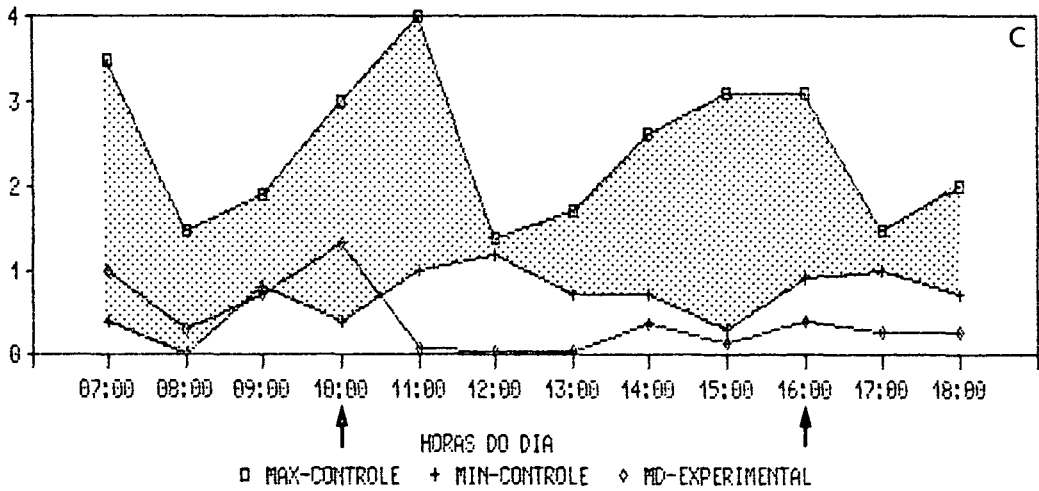
Observa-se, pelos resultados obtidos, que os peixes intoxicados apresentaram frequência de procura de alimento inferior à dos controles normais. Verifica-se que, após 24 horas da administração da droga, os animais procuraram o alimento sem contudo se alimentarem. Apenas no 5º dia, esse comportamento tornou-se mais frequente.





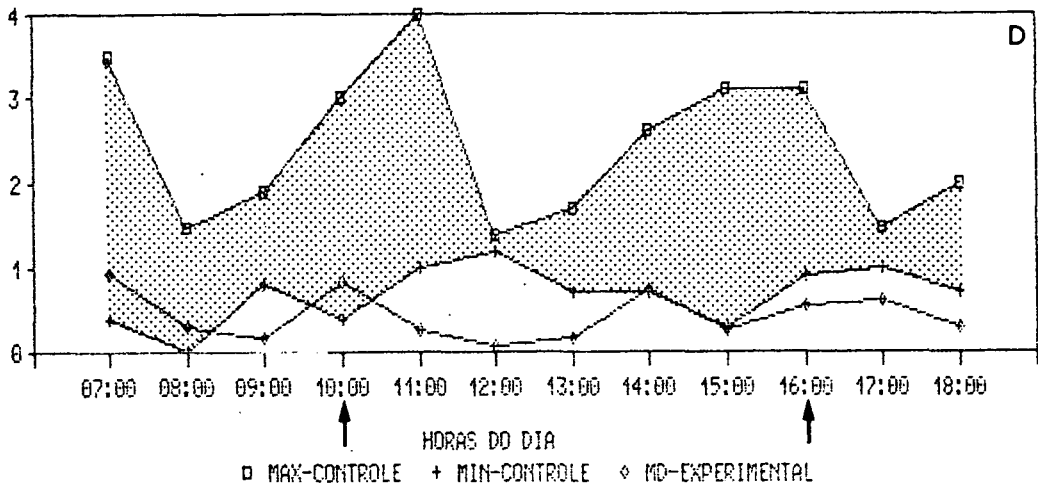
PROCURA DE ALIMENTO(vezes/min)

DIA 3 - PADRAO DE PROCURA DE ALIMENTO



PROCURA DE ALIMENTO(vezes/min)

DIA 4 - PADRAO DE PROCURA DE ALIMENTO



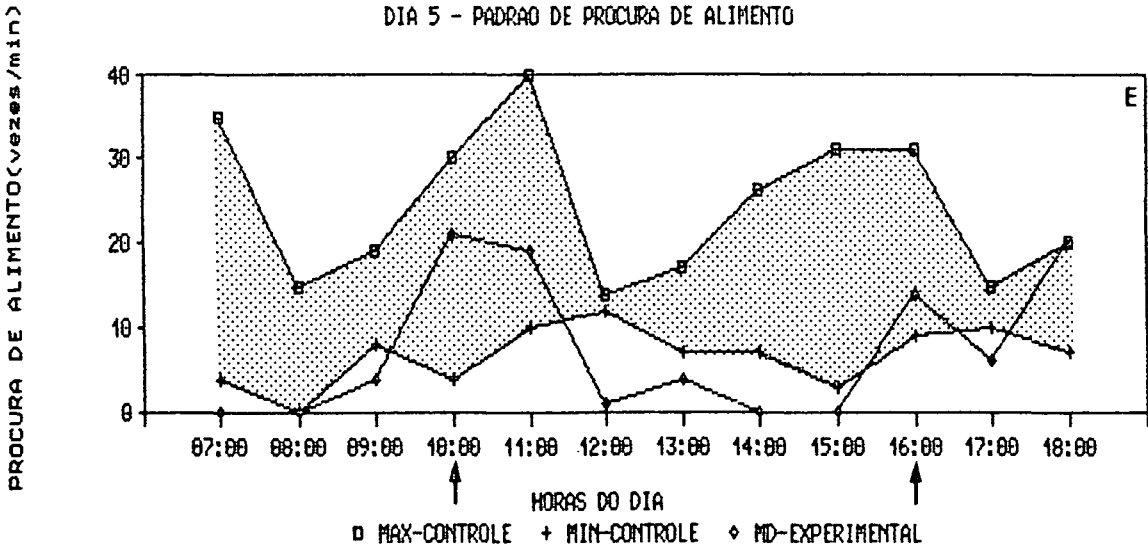
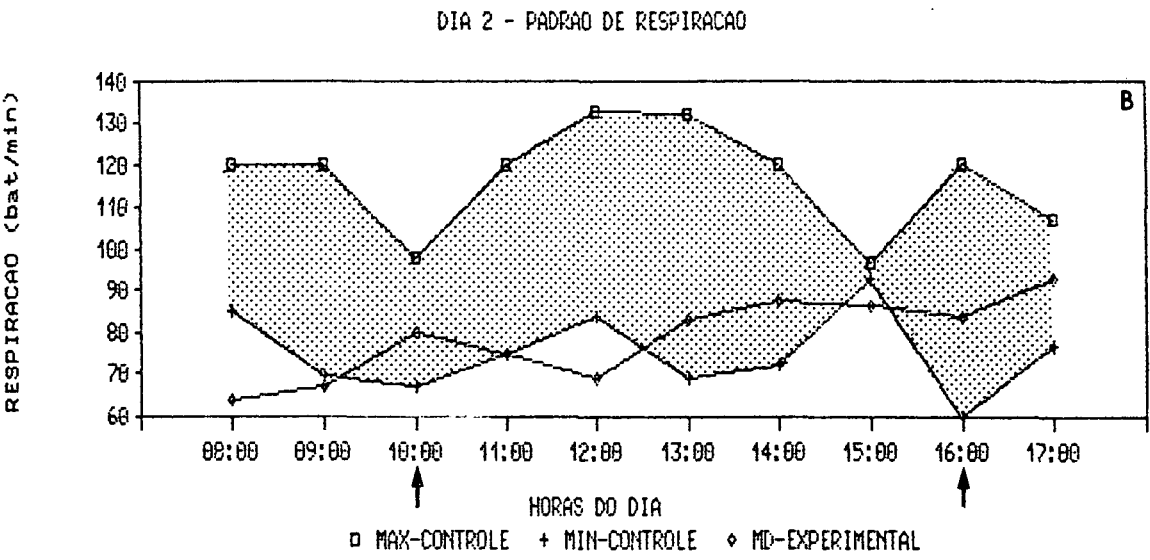
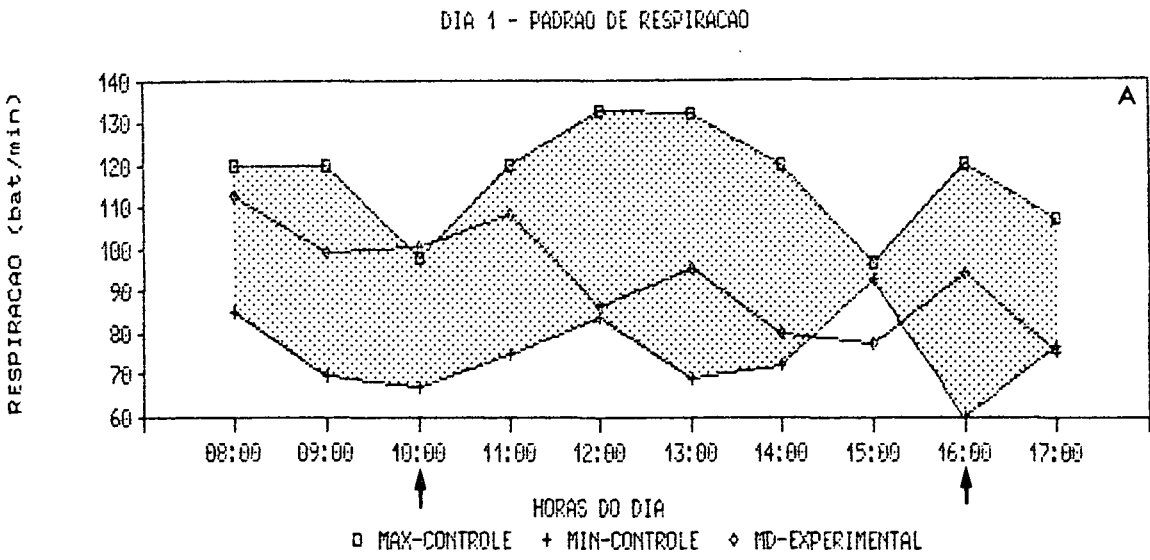


Figura 17. Efeito do Folidol 600 no padrão de procura de alimento do Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de procura de alimento. A curva (◇ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de procura de alimento do 2º dia; C, padrão de procura de alimento do 3º dia; D, padrão de procura de alimento do 4º dia; E, padrão de procura de alimento do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). A frequência de procura de alimento está expressa em número de vezes por minuto.

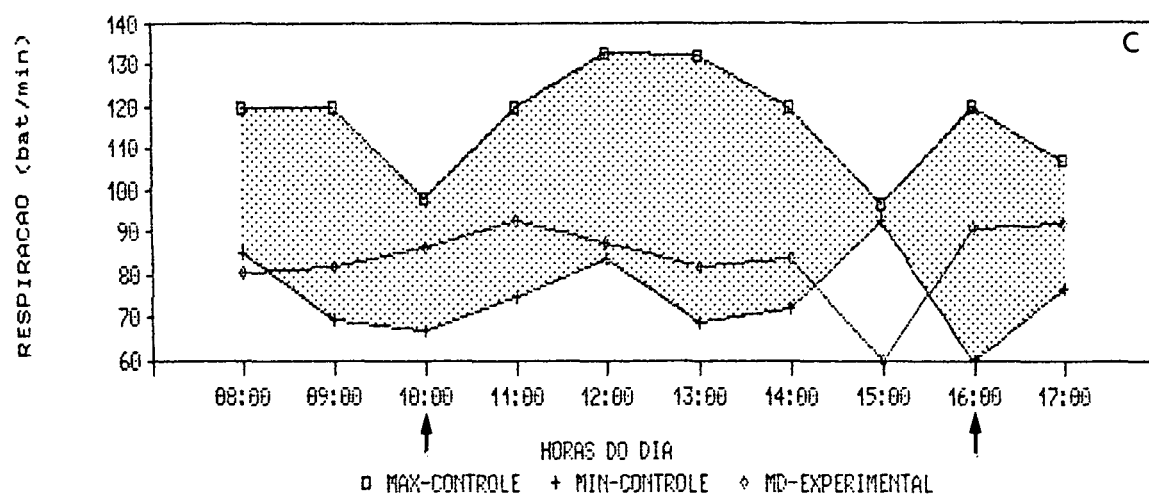
3.3.6. Efeito do Folidol 600 no padrão de respiração do Callichthys callichthys

O efeito exercido pelo Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg/kg de Paration metílico, sobre o padrão de respiração do Callichthys callichthys, foi analisado. As Figs. 18A a 18E demonstram os eventos ocorridos ao longo do experimento (120 horas de observação), registrados a partir da administração da substância (tempo "zero") no período de iluminação (8:00 às 18:00 horas). Foram feitas observações às 7:00 e às 18:00 horas, no período escuro (noite), para verificação da ocorrência de uma possível mudança comportamental referente ao estímulo do início e do término do ciclo luminoso.

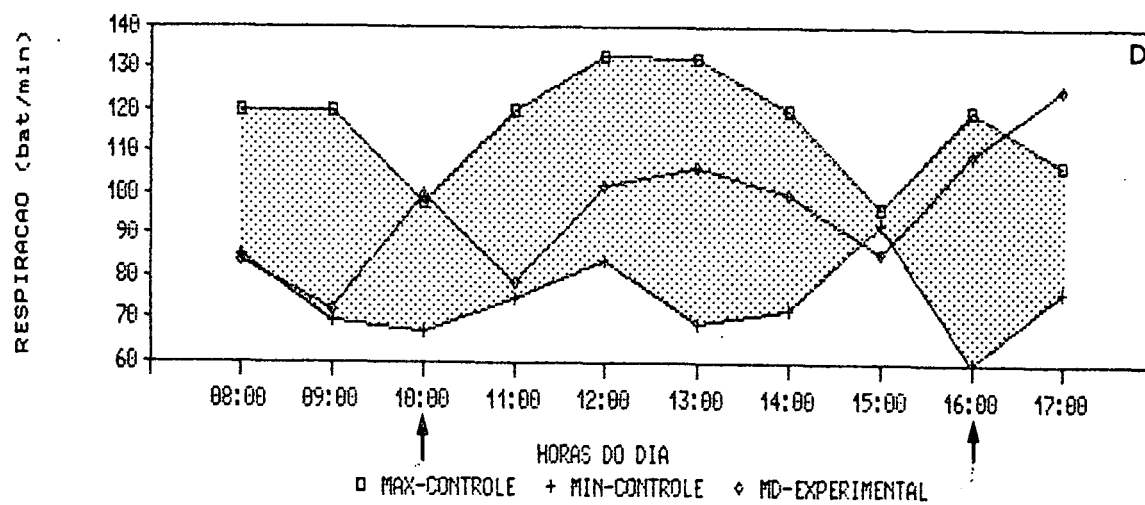
Verifica-se pelos resultados obtidos, que os peixes intoxicados apresentaram frequência respiratória que variou, aproximadamente, de 60 a 120 batimentos por minutos ao longo do experimento. Observa-se que esses valores estão dentro dos padrões normais de respiração. Entretanto a amplitude opercular foi maior do que a normal, principalmente durante as primeiras 48 horas após a inoculação.



DIA 3 - PADRAO DE RESPIRACAO



DIA 4 - PADRAO DE RESPIRACAO



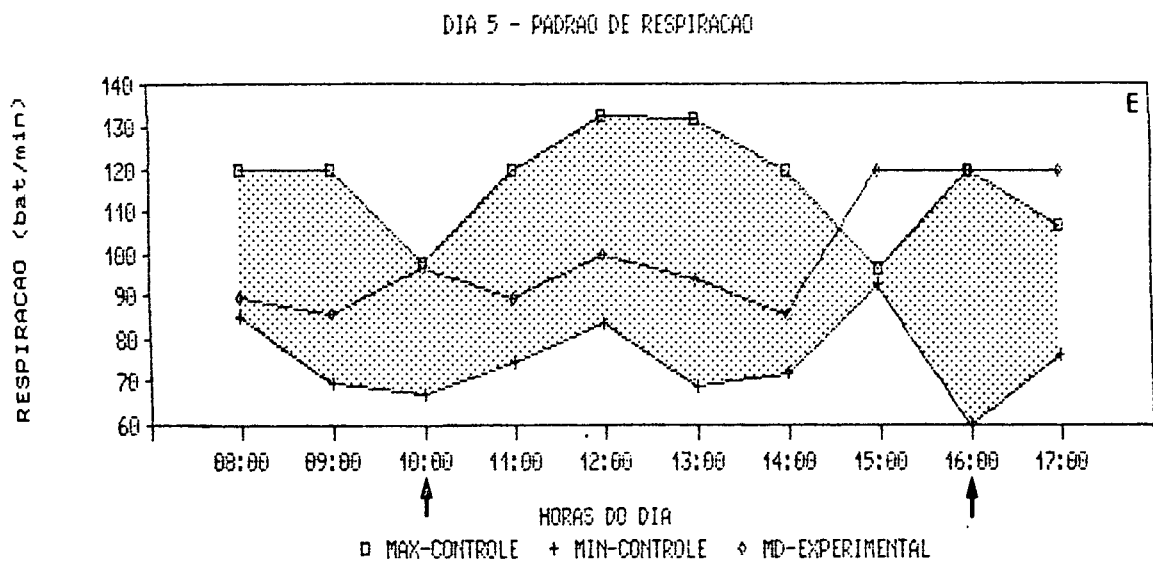


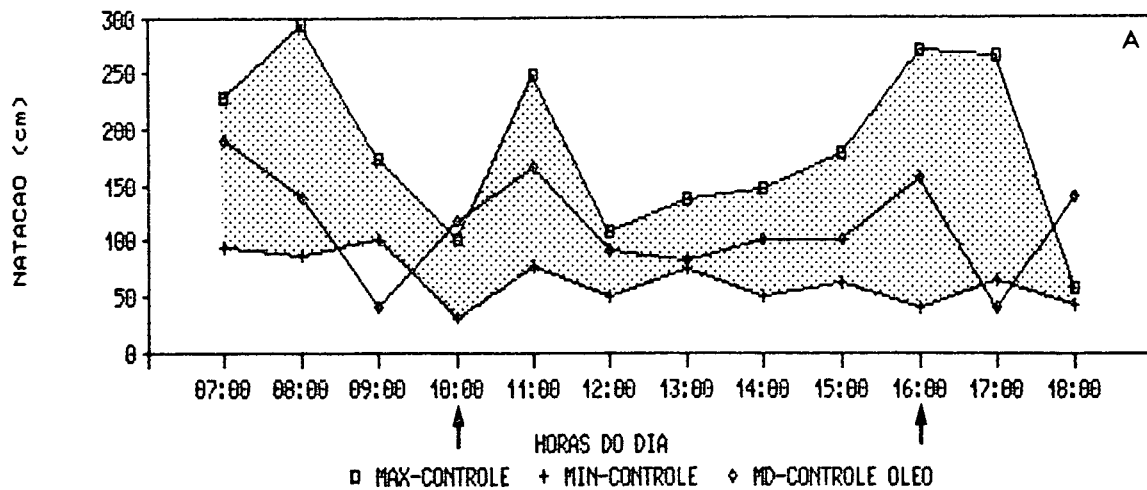
Figura 17. Efeito do Folidol 600 no padrão de respiração do Callichthys callichthys. Trinta e dois animais tratados com Folidol 600 na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, foram distribuídos em 8 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 8:00 às 18:00 horas. Do grupo de animais controle normais, foram determinados valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle). A faixa sombreada representa a variação do padrão de respiração. A curva (♦ md-experimental) foi obtida como média experimental dos animais intoxicados. A, comportamento no "tempo zero" medido às 7:00 horas e na continuidade do 1º dia; B, padrão de respiração do 2º dia; C, padrão de respiração do 3º dia; D, padrão de respiração do 4º dia; E, padrão de respiração do 5º dia após administração da droga. As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas). A frequência respiratória está expressa em número de batimentos operculares por minuto.

3.3.7. Efeito do óleo de milho nos padrões de natação, velocidade de natação, tempo de repouso, subidas à superfície, procura de alimento e frequência respiratória.

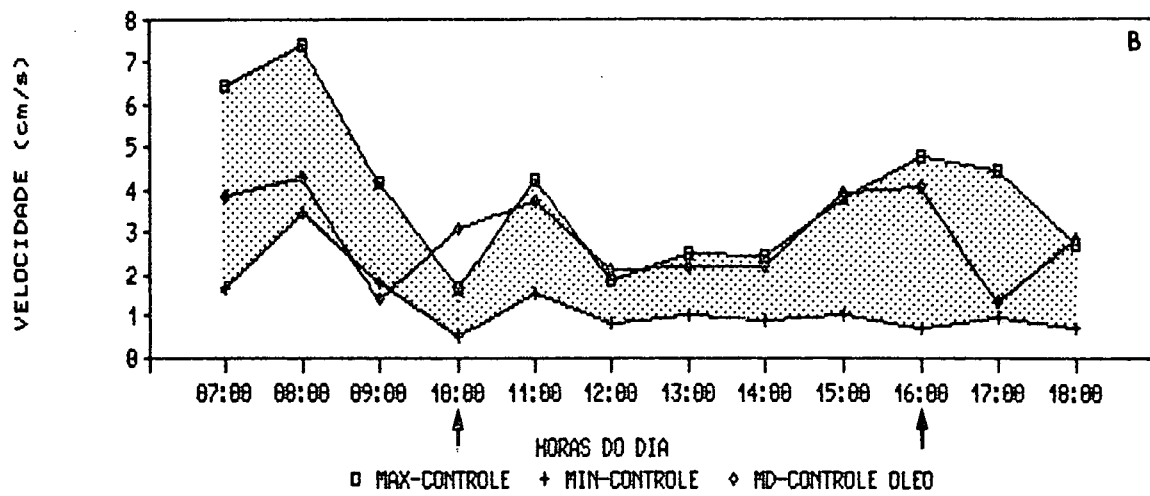
Como o óleo de milho foi o material utilizado como veículo para administração do Folidol 600, experimentos foram conduzidos no sentido de estabelecer o seu efeito sobre o comportamento dos peixes em experimentação. As Figs. 19A a 19 F mostram, respectivamente, o efeito do óleo de milho sobre o padrão de natação, velocidade de natação, tempo de repouso, subidas à superfície, procura de alimento e frequência respiratória.

Verifica-se que a média dos resultados encontrados para os peixes tratados com óleo de milho permaneceu dentro dos padrões normais. O tempo de repouso foi mais acentuado, porém acompanhando a curva normal.

PADRAO DE NATACAO

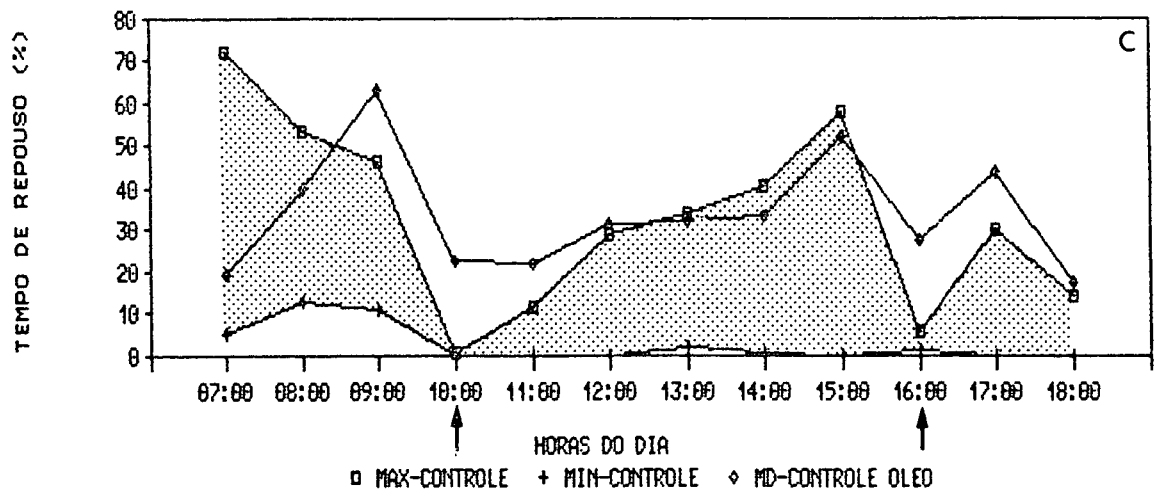


PADRAO DE VELOCIDADE DE NATACAO

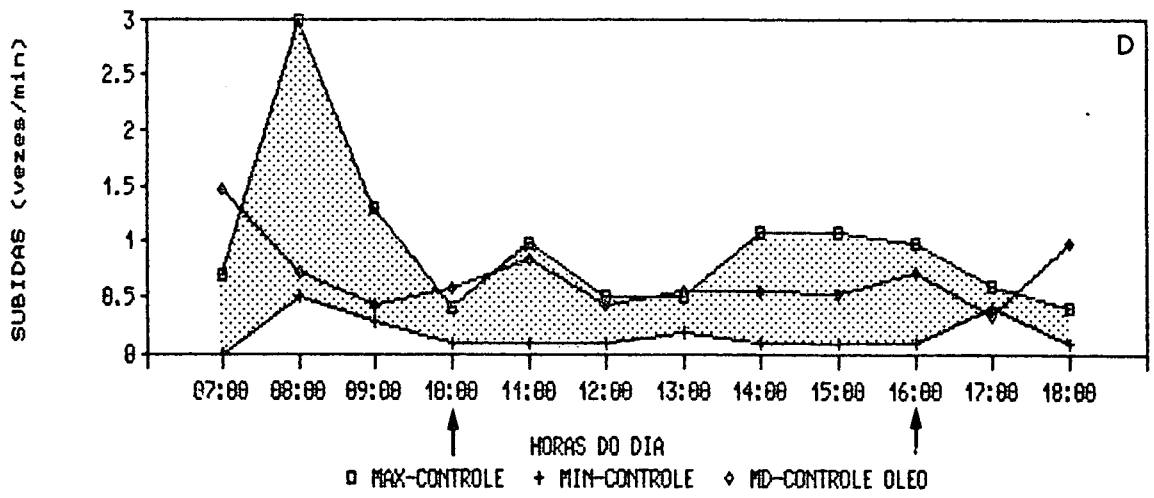


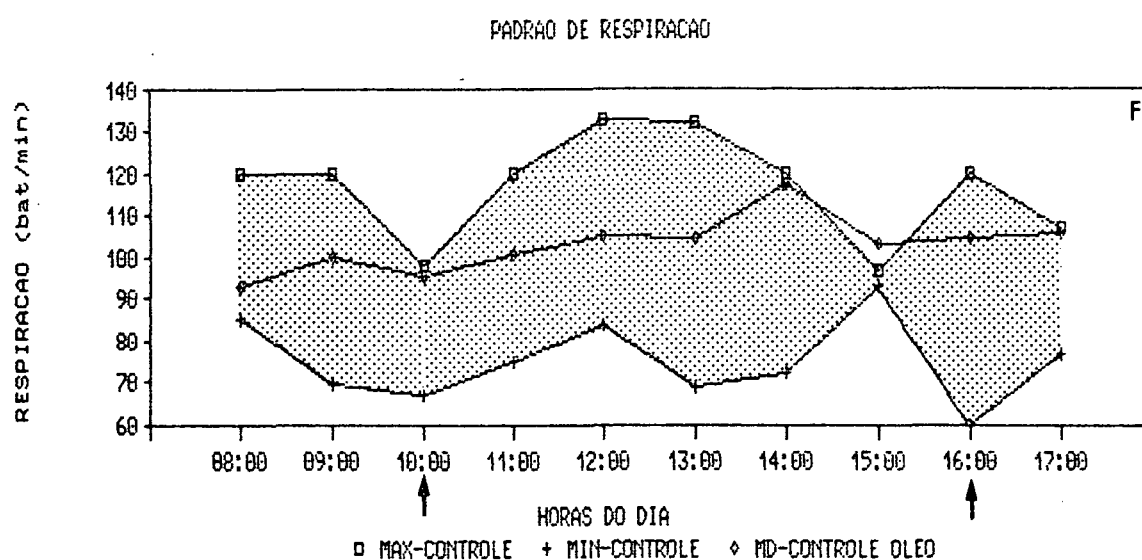
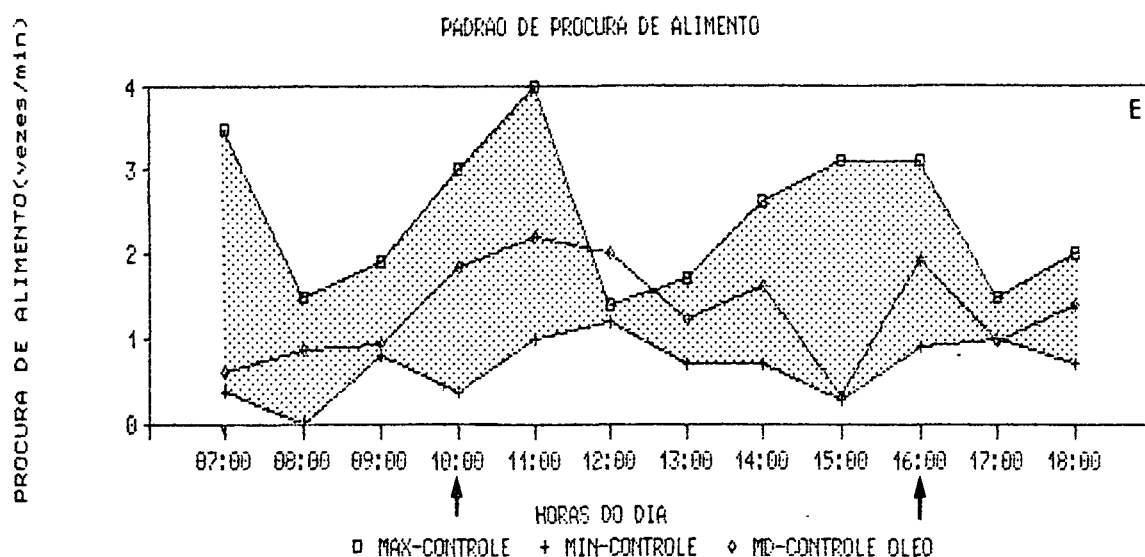


PADRAO TEMPO DE REPOUSO



PADRAO DE SUBIDAS A SUPERFICIE





Figuras 19A a 19F. Efeitos do óleo de milho sobre o comportamento do Callichthys callichthys. A, efeito sobre o padrão de natação ao longo do experimento (120 horas); B, efeito sobre a velocidade de natação; C, efeito sobre o tempo de repouso; D, efeito sobre a frequência de subidas à superfície; E, efeito sobre a procura de alimento e F, efeito sobre a frequência respiratória. Doze animais tratados com óleo de milho, foram distribuídos em 3 aquários e observados durante o ciclo luminoso de 10 horas de duração, tendo início às 8:00 horas. Dos animais controles normais foram determinados os valores máximos (□ max-controle) e os mínimos (+ min-controle), sendo que a faixa sombreada entre as duas curvas representa a variação do padrão normal de Callichthys callichthys. A curva traçada com os valores médios dos dados dos controles de óleo (◇ md-experimental), foi superposta à faixa normal. Observam-se assim os resultados obtidos em 10 minutos de observação correspondentes ao padrão de natação (expresso em cm), velocidade de natação (cm/s), tempo de repouso (%), subidas à superfície (vezes/min), procura de alimento (vezes/min) e frequência respiratória (batimentos/min). As flechas indicam os horários de alimentação (10:00 e 16:00 horas).

3.4. Efeito do Folidol 600 sobre a atividade da colinesterase plasmática do Callichthys callichthys.

Foi estudado o efeito exercido pelo Folidol 600, na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, sobre a atividade da colinesterase plasmática do Callichthys callichthys.

As Figs. 20 e 21 mostram a inibição da enzima a partir de 4 horas após a administração da droga, e a sua recuperação ao longo de 37 dias.

Verifica-se, pelos resultados obtidos, que nos animais intoxicados ocorreu inibição da colinesterase em cerca de 90%, medido após 4 horas da administração do Folidol 600, mantendo-se esse nível constante durante oito a dez dias. Apenas a partir do décimo dia após a administração do organofosforado, os peixes começaram a recuperar os níveis enzimáticos da colinesterase atingindo 90% de atividade entre o 34<sup>o</sup> e o 37<sup>o</sup> dia.

Nesse período, os peixes apresentaram a sintomatologia de intoxicação descrita no item 3.3. Após 8 dias da administração do Folidol 600 os tamboatás passaram a ter um comportamento normal, com natação rítmica e coordenada. O tempo de repouso continuou mais elevado em comparação aos valores normais. Quanto a postura de repouso, os peixes não mais se agruparam e deixaram de repousar apoiados apenas na nadadeira caudal, em ângulo de 45<sup>o</sup> em relação ao substrato (Fig. 14).

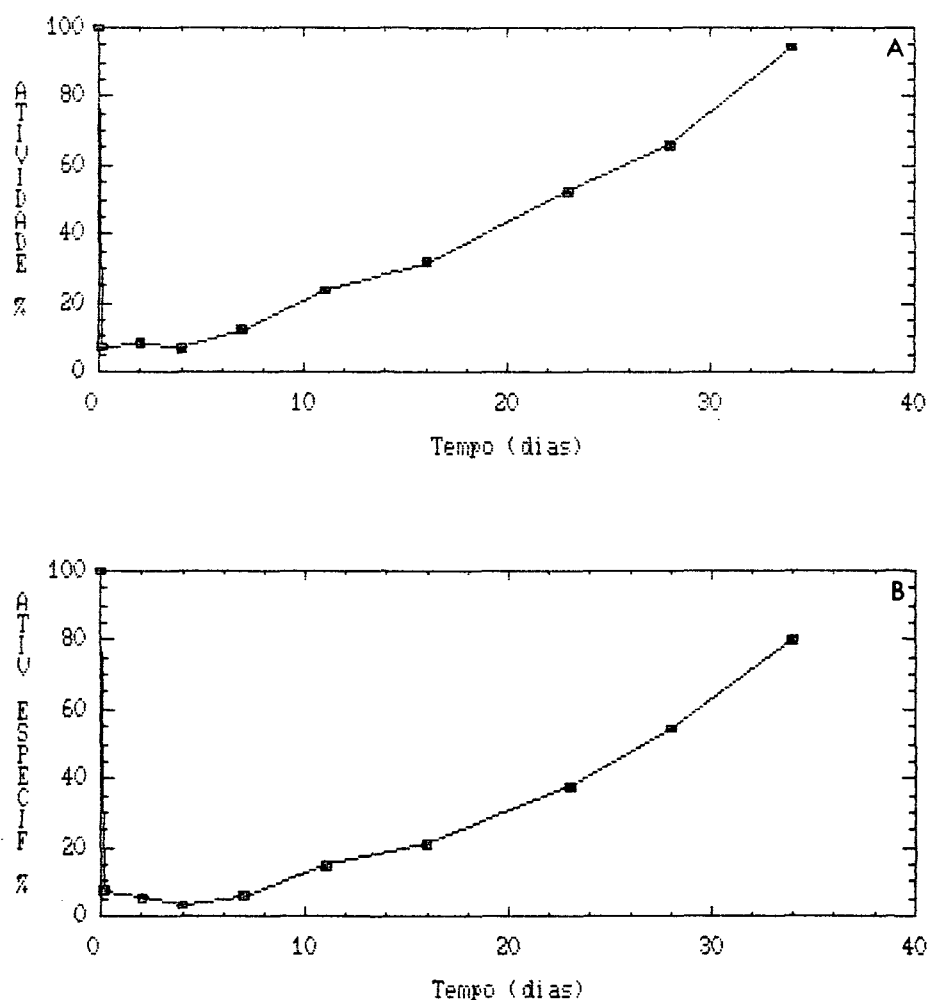


Figura 20. Efeito do Folidol 600 sobre a atividade da colinesterase plasmática do *Callichthys callichthys*. A, percentual relativo de atividade enzimática em unidades de enzima. B, percentual relativo de atividade enzimática específica medido como relação entre unidades de enzima por L/g de proteína plasmática por L (Uenz.L/g de proteína por L). O tempo "zero" mostrado corresponde aos níveis normais de colinesterase plasmática obtidos como média da determinação de 36 animais. A primeira medida de atividade da colinesterase dos animais intoxicados foi procedida 4 horas após a administração do composto organofosforado Folidol 600 seguindo até 34 dias.

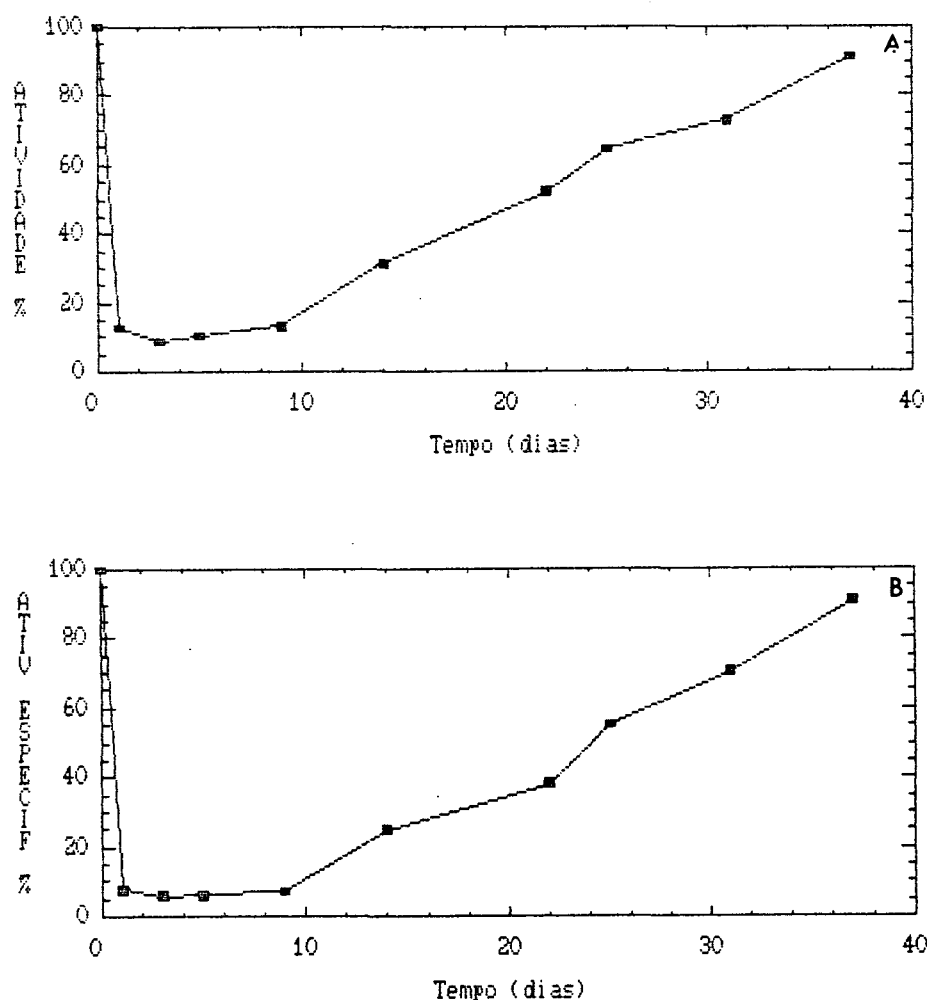


Figura 21. Efeito do Folidol 600 sobre a atividade da colinesterase plasmática do *Callichthys callichthys*. A, percentual relativo de atividade enzimática em unidades de enzima. B, percentual relativo de atividade enzimática específica medido como relação entre unidades de enzima por L/g de proteína plasmática por L (Uenz.L/g de proteína por L). O tempo "zero" mostrado corresponde aos níveis normais de colinesterase plasmática obtidos como média da determinação de 36 animais. A primeira medida de atividade da colinesterase dos animais intoxicados foi procedida 24 horas após a administração do composto organofosforado Folidol 600 seguindo até 37 dias.

### 3.5. Efeito do Folidol 600 sobre a morfologia renal e hepática do Callichthys callichthys

O efeito exercido pelo Folidol 600, na dose de 500 mg/kg, correspondente a 270 mg de Paration metílico por kg de peso, sobre a morfologia renal e hepática do Callichthys callichthys foi analisado.

As Figs. 22 a 25 mostram as lesões encontradas no rim e no fígado dos animais sacrificados após 96 e 120 horas da administração da droga.

Observa-se pelos resultados obtidos que tanto os animais do grupo controle normal como o tratado com óleo de milho apresentaram algumas lesões produzidas por helmintos, com reação inflamatória aguda e crônica em torno dos parasitos.

Os animais experimentais mostraram 4 e 24 horas após a administração do Folidol 600 as mesmas lesões mencionadas nos grupos controles.

Observou-se no rim dos animais sacrificados 48 horas após a administração do Folidol 600, necrose de raras células epiteliais em túbulos contornados proximais.

Nos animais sacrificados 72 horas após a administração do Folidol 600, foi observado no rim degeneração parenquimatosa e necrose de células epiteliais em túbulos contornados proximais.

Após 96 horas da administração do Folidol 600 foi observado no rim degeneração e necrose do epitélio tubular, mais acentuada nos túbulos contornados proximais e no fígado necrose focal e degeneração vacuolar nuclear (Figs. 22 e 23).

Nos peixes sacrificados 120 horas após a administração do Folidol 600, as lesões se repetiram. No fígado foi observado degeneração vacuolar nuclear e necrose focal, e no rim degeneração e necrose do epitélio tubular. Essas lesões foram mais intensas que as observadas nos animais sacrificados após 96 horas (Figs. 24 e 25). A reação de PAS permitiu perceber em um dos animais desse grupo uma acentuada redução no glicogênio hepático.

Alguns aglomerados pigmentares presentes no rim deram reação positiva para o ferro.

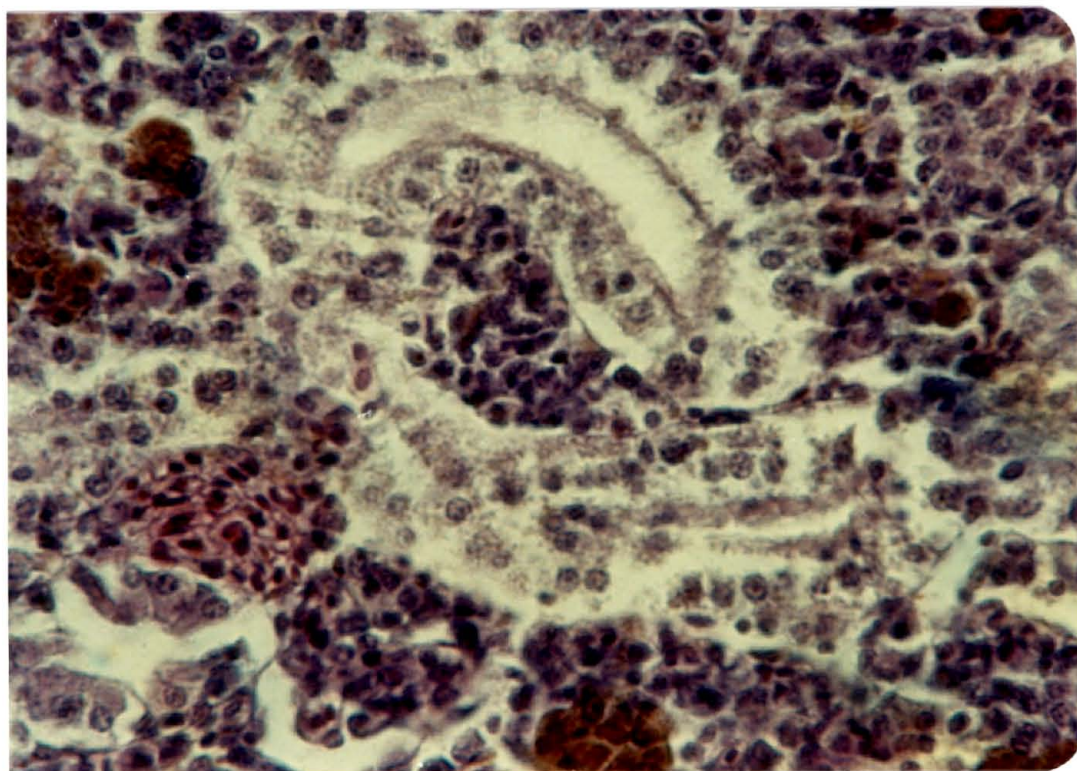


Figura 22. Aspectos histopatológicos das lesões renais produzidas pelo Folidol 600 em Callichthys callichthys. Formol + ácido fôrmico, HE x 500. Os peixes sacrificados após 96 horas da administração da droga apresentaram degeneração e necrose do epitélio dos túbulos contornados proximais.



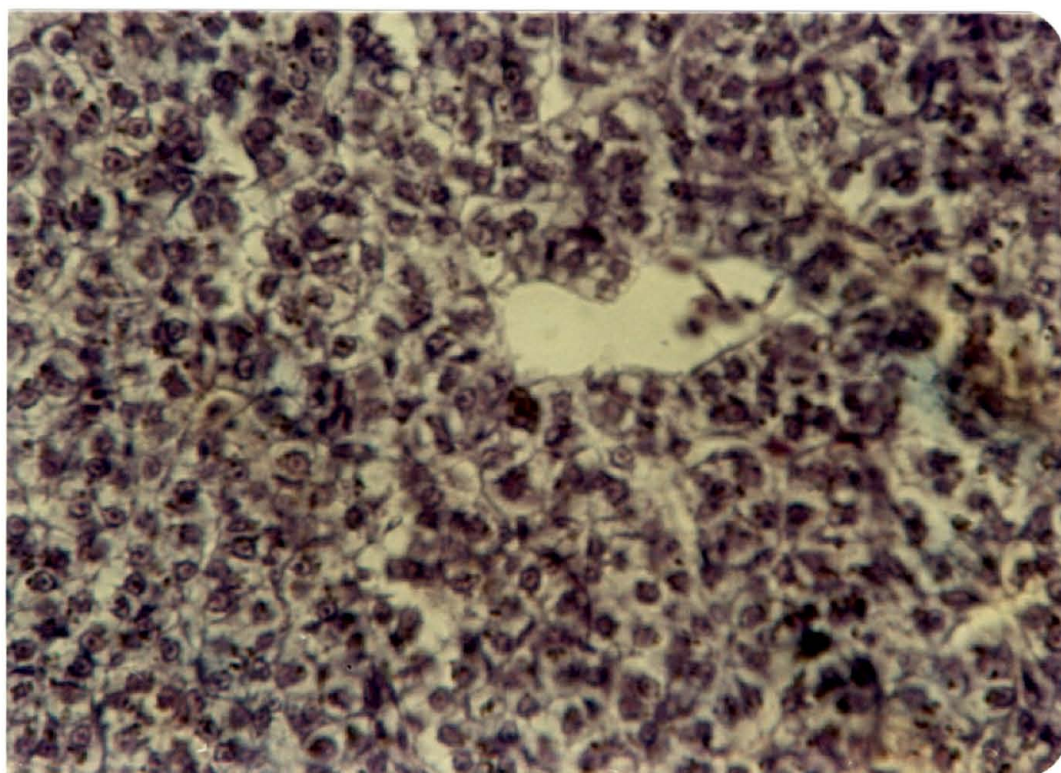


Figura 23. Aspectos histopatológicos das lesões hepáticas produzidas pelo Folidol 600 em Callichthys callichthys. Formol + ácido fórmico, HE x 500. Os peixes sacrificados após 96 horas da administração da droga apresentaram degeneração vacuolar nuclear e necrose focal.

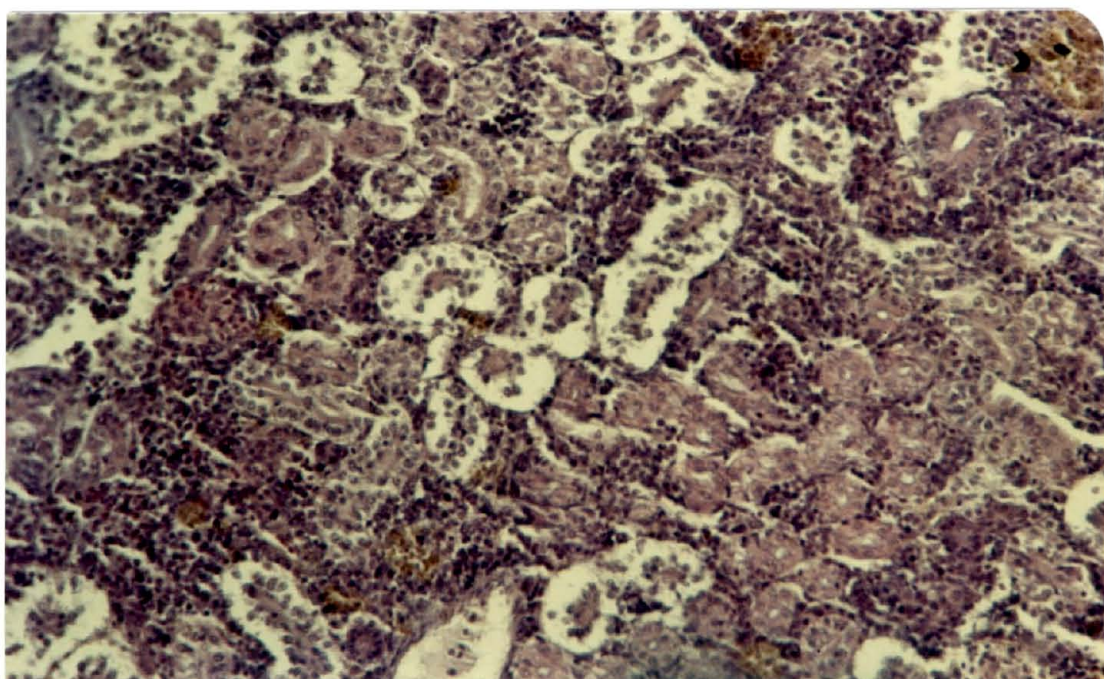


Figura 24. Aspectos histopatológicos das lesões renais produzidas pelo Folícol 600 em Callichthys callichthys. Formol + ácido fórmico, HE x 200. Os peixes sacrificados após 120 horas da administração da droga apresentaram degeneração e necrose do epitélio tubular.



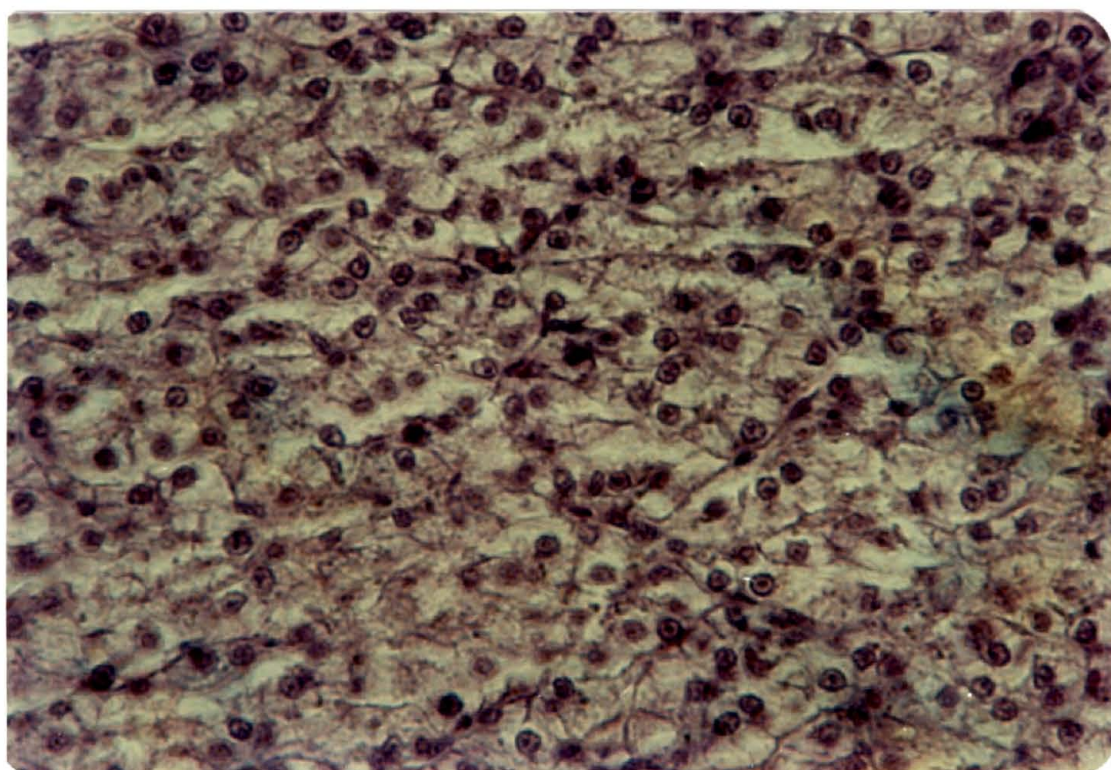


Figura 25. Aspectos histopatológicos das lesões hepáticas produzidas pelo Folidol 600 em Callichthys callichthys. Formol + ácido fórmico, HE x 500. Os peixes sacrificados após 120 horas da administração da droga apresentaram degeneração vacuolar nuclear e necrose focal.

#### IV. DISCUSSÃO

Quando substâncias anticolinesterásicas foram empregadas em neurofisiologia experimental, acreditava-se que as referidas drogas tivessem, na pós-sinapse, o ponto de lesão bioquímica, desenvolvendo como efeito, atividade inibidora da acetilcolinesterase.

Presentemente, há seguras indicações de que a ação primária das anticolinesterases está relacionada com a transmissão colinérgica e com as colinesterases.

Por outro lado, as ações produzidas por esse grupo de drogas são mais complexas do que se poderia acreditar pois, no campo da transmissão colinérgica, as anticolinesterases afetam tanto as áreas pré-sinápticas como, também, as pós-sinápticas. E assim que as anticolinesterases facilitam as sinapses, modificam a permeabilidade da membrana e podem produzir efeitos neurotóxicos.

Os estudos sobre a neurotoxicidade produzida pelos organofosforados tiveram início quando foi constatado que os efeitos tardios de neurotoxicidade apresentados por pessoas que utilizavam gengibre da Jamaica, eram devidos à presença, como contaminante, do triortocresil fosfato, empregado no preparo da bebida. Embora o triortocresil fosfato não seja empregado como inseticida, os seus efeitos tóxicos e as suas propriedades de neurotoxicidade acompanham de perto as lesões bioquímicas apresentadas pelos organofosforados utilizados como pesticidas.

As perturbações associadas à neuropatia

organofosforada no homem ou nos animais sensíveis, se iniciam por perturbações sensoriais, fazendo-se acompanhar de fraqueza muscular e de ataxia progressiva cuja severidade e extensão atingem as pernas, tornando-as flácidas e fracas. As observações de ALDRIDGE & JOHNSON (1971), mostram que o homem e as aves são as espécies mais sensíveis aos efeitos dos referidos tóxicos, muito embora outros animais possam ser igualmente afetados.

De qualquer maneira, as galinhas atropinizadas passaram a se constituir em ótimos bioindicadores para detectar a presença e a intoxicação produzida pelos organofosforados. Como uma das características dos inibidores da colinesterase é a de ressaltar as propriedades do amônio quaternário da acetilcolina, a atropinização prévia da galinha impede a morte do animal.

Entre os pacientes humanos que resistiram à intoxicação e, portanto, sobreviveram, a recuperação da força muscular, do movimento e da própria sensibilidade, foram, em alguns casos, lentas e demoradas. Casos houve onde o comprometimento das vias nervosas foi de tal ordem que se tornaram irreversíveis e permanentes, fato que permite supor um comprometimento grave dos segmentos proximais das raízes dos nervos espinhais.

Condições outras, não ligadas à toxicidade natural do veneno, podem modificar os aspectos e a sequência da intoxicação. A sintomatologia produzida pelos diferentes fosforados pode diferir ou variar de um composto para outro em função das vias de acesso, da distribuição, da biotransformação ou então, da

afinidade . apresentada pelo veneno para acetilcolinesterase ou por qualquer outro receptor inespecífico contido no corpo animal.

De maneira geral, as substâncias organofosforadas de uso comum são relativamente bem excretadas ou mesmo metabolizadas, a não ser que se processe acúmulo da droga no organismo ou, então, quando a própria acetilcolinesterase retem mais firmemente o inibidor. Nessa situação, os sinais e os sintomas do envenenamento se assemelham na intensidade e na gravidade aos produzidos por uma única dose forte ou pela sucessão de pequenas doses, todas atingindo um acúmulo crítico, deixando sequelas crônicas bastante graves.

A Tab. 2 (LARINI, 1979) resume os sinais e sintomas apresentados pelo homem quando submetidos ao envenenamento pelos organofosforados.

Afora os efeitos colaterais inerentes ao próprio preparado comercial, os sinais e os sintomas exteriorizados pela intoxicação organofosforada são inteiramente devidos aos efeitos farmacológicos - muscarínicos e nicotínicos - produzidos pelo amônio quaternário da acetilcolina que se acumula nos locais da inibição ou na placa motora da musculatura estriada.

Na intoxicação organofosforada, aparecem primeiro os efeitos muscarínicos pelo fato do segundo neurônio do parassimpático estar localizado na parede dos órgãos, próximo dos receptores periféricos do parassimpático. Os efeitos muscarínicos são muito mais marcantes do que os nicotínicos e também mais dramáticos.

TABELA 2. SINAIS E SINTOMAS NA INTOXICAÇÃO POR INSETICIDAS  
ORGANOFOSFORADOS.

SINAIS E SINTOMAS			
LOCAL		PRECOCES	TARDIOS
1 - Sistema Nervoso Central	Alterações neuropsiquiátricas	Tensão, ansiedade, inquietude	Alterações do sono e pesadelos; dificuldade de concentração; comprometimento de memória
	Alterações neurológicas puras	Cefaléa, tonteira e vertigens	Convulsões; atonia; tremores; confusão; torpor e coma; soluços e manifestações extra-piramidais; tremores involuntários, marcha atáxia e incoordenação dos movimentos.
2 - Sistema Nervoso Autônomo	2.1 - Efeitos muscarínicos:		
	Sistema Respiratório	Aumento do ritmo resp.	Rinorréia; secreção bronquiolar excessiva; edema pulmonar; dispnéia; opressão torácica
	Aparelho digestivo	Perda de Apetite	Náuseas, vômitos, dores abdominais, diarreia, defecação involuntária.
	Sistema Circulatório	Pulso diminuído	Braquicardia, bloqueio auriculoventricular; parada cardíaca
	Oculares	Visão enfraquecida; discreta miose	Miose; pupilas puntiformes sem reação.
	Geniturinário		Diurese frequente e involuntária
	Glândulas exócrinas	Lacrimagem; aumento das secreções salivar e nasal	Transpiração excessiva
	2.2 - Efeitos Nicotínicos	Fadiga; fraqueza muscular; contrações invol.	Cãimbras, fasciculações, enfraquecimento muscular generalizado

Investigações indicaram que, em geral, os compostos organofosforados são menos tóxicos que os clorados, e o seu uso tem aumentado significativamente (ANON, 1959). Em uma revisão dos efeitos dos pesticidas na vida aquática, HOFFMANN (1960) salienta que alguns organofosforados são altamente tóxicos para certas espécies de peixes.

Apesar da sintomatologia muscarínica e da nicotínica ser tão pronunciada nos mamíferos, não existe, segundo PICKERING et al (1962), nítida correlação de efeitos entre os peixes e os mamíferos. Alguns compostos organofosforados são relativamente menos tóxicos para mamíferos do que para peixes e vice-versa. Estas diferenças podem permitir o desenvolvimento de metodologias para o monitoramento das águas frente aos organofosforados utilizando-se peixes sensíveis como bioindicadores. Exemplificando, a tolerância humana para o Sarin, organofosforado de uso militar, é de 0,5 mg por litro de água. Essa concentração contudo, pode ser facilmente detectada, em 8 minutos, utilizando-se o peixe como bioindicador (PICKERING & HENDERSON, 1959). Além disso, a sensibilidade de várias espécies de peixes pode ser importante auxiliar na identificação qualitativa de inseticidas organofosforados que contaminam eventualmente mananciais de água e cuja natureza é desconhecida.

Dentre a longa lista de intoxicantes do meio ambiente, o organofosforado Folidol 600 Bayer, é um dos inseticidas de mais largo emprego na agricultura do Estado do Paraná. A sua utilização, diluído em água, é feita por aparelhos costais,



tratorizados, ou ainda por meio de aeronaves. Com isso, é fácil imaginar que esse inseticida acabe por contaminar as águas vicinais das glebas cultivadas, diretamente ou carregado pelas chuvas. Um dos seus efeitos mais deletérios é o de que os organismos aquáticos, particularmente os peixes, são afetados por tal prática.

Assim, para o presente estudo, procurou-se utilizar um produto formulado, já que são esses os que produzem toxicidade nos organismos aquáticos.

Os pesticidas são formulados como concentrados emulsificáveis, preparações granuladas, aerossóis ou pó, os quais auxiliam na dispersão do composto. De acordo com MURTY (1986), a avaliação da toxicidade dos pesticidas não é suficiente se apenas o composto puro é avaliado. Os organismos aquáticos podem ser ocasionalmente expostos a formulações e, em geral, concentrados emulsificáveis são mais tóxicos que o princípio ativo por si só.

Essa opinião é também compartilhada por PICKERING (1963) que, em experimentos conduzidos para comparar a toxicidade dos organofosforados com algumas formulações comerciais, verificou que os formulados foram mais tóxicos do que o produto técnico.

Assim, é muito importante analisar os efeitos de doses subletais de um produto comercial como o Folidol 600 em peixes, com a finalidade de estabelecer procedimentos de controle de contaminação das águas. Por outro lado, a análise do efeito biológico de inseticidas como o Paration metílico possui, por si

só, interesse acadêmico no sentido de analisar com mais acurácia e, se possível, a nível celular, os efeitos por ele produzidos em organismos animais.

Em experimentos prévios com Tilapia rendalli (FANTA et al, 1988) constatou-se que a administração intracelomática de doses de 2000 e 1000 mg/kg de Folidol 600 ocasionaram a morte dos animais experimentais. Na dose de 500 mg/kg, os peixes não morreram, porém apresentaram sintomatologia tóxica como agitação, perda de equilíbrio e maior agressividade. As lesões hepáticas caracterizaram-se por hepatócitos vacuolizados e tumefatos, com núcleos na periferia, lesões essas que progrediram ao longo do experimento, até um estado de necrose focal e desorganização do parênquima.

BENKE & MURPHY (1974) haviam estabelecido dose letal de Paration metílico superior a 2500 mg/kg de peso, o que corresponderia a aproximadamente 5000 mg/kg de Folidol 600, para Lepomis gibbosus ("sunfish").

Em C. callichthys, doses de Folidol 600 de 2000 e 1000 mg por kg de peso, provocaram a morte dos peixes em prazo que variou de 40 minutos a 48 horas, respectivamente. Os tamboatás mostraram sintomatologia de intoxicação nessas doses, correspondente à sequência de etapas de envenenamento em peixes (Fig. 26) de acordo com REICHENBACH-KLINKE (1980). Em uma primeira fase, o peixe demonstra comportamento normal. Na fase de difusão, reage à ação da substância com sintomas que podem variar com a via de administração e com a droga. No C. callichthys,

observou-se tentativa de fuga, como se tentasse esquivar-se do foco de ação prejudicial e que se caracteriza por período de agitação. A fase de manifestação está relacionada com aquela em que os peixes externam um acúmulo de sinais e sintomas causados pelos tóxicos. Nessa fase, os peixes apresentaram como sintomas mais evidentes, perda de equilíbrio, mudança de coloração e anorexia.

Na fase de letalidade, aparecem as lesões permanentes, que vão se tornando irreversíveis e progressivas. De forma paulatina, provocam a morte. A sintomatologia do C. callichthys relacionada com essa fase caracterizou-se por permanecerem no fundo do aquário, executando movimentos descoordenados das nadadeiras, sem contudo conseguirem se locomover. Esses movimentos continuaram até o estágio de morte.

Em comparação com a sintomatologia precoce da intoxicação por inseticidas organofosforados em seres humanos (Tab. 2), os peixes apresentaram alterações nervosas como ansiedade, agitação e perda de equilíbrio. Como efeitos muscarínicos, apenas pode-se citar anorexia e aumento do ritmo respiratório superficial que nos peixes manifestou-se por maior amplitude opercular. Os efeitos nicotínicos relacionam-se com o período em que os animais permaneceram no fundo do aquário demonstrando certa fraqueza muscular, com movimentos natatórios descoordenados, na tentativa de se deslocarem, bem como contrações involuntárias exteriorizadas por trismas nas nadadeiras.

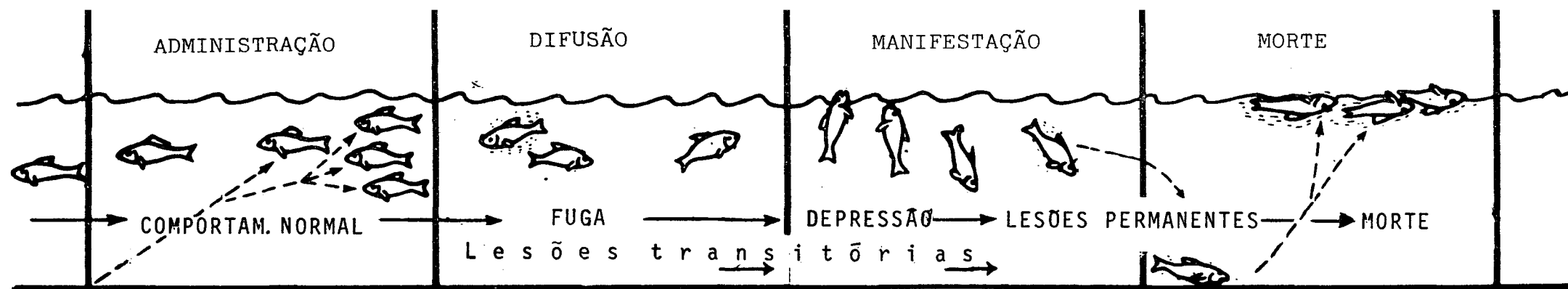


Figura 26. Fases da intoxicação de peixes por pesticidas (Modificado de REICHEMBACH - KLINKE, 1980).

Verifica-se que os sintomas em C. callichthys correspondem, apenas, aos efeitos precoces em seres humanos, possivelmente por se tratar de um experimento agudo. Se este tivesse sido prolongado até um nível crônico, eventualmente mais sintomas correlacionados com os que ocorrem no homem poderiam ser verificados.

Callichthys callichthys se mostrou um excelente organismo para estudos dessa natureza, já que se adapta muito às condições de confinamento em aquários experimentais, sendo facilmente manuseado e resistente a operações tais como administração de drogas, punção cardíaca contínua e outros processos de manejo.

Um dos procedimentos mais adequados para o estudo dos efeitos tóxicos de drogas em peixes é, sem dúvida, a análise das alterações que pode o animal sofrer quanto à sua biologia comportamental. Para tanto, são utilizados vários sinais e sintomas de comportamento normal estabelecidos quando os peixes são mantidos em condições adequadas e padronizadas de temperatura, salinidade, oxigenação e de concentração hidrogeniônica, que permitem conhecer, para cada espécie de peixe, a maneira pela qual comporta-se no seu ambiente. Eventualmente, esse comportamento pode ter ritmo circadiano.

As alterações comportamentais dos peixes intoxicados com 500 mg/kg de Folidol 600 foram, então, estudadas e devidamente analisadas quanto aos efeitos causados pelo Paration metílico (Figs. 12 a 18).

Os peixes intoxicados apresentaram valores de natação abaixo daqueles obtidos com os animais normais ou injetados com óleo de milho. Contudo, quando nadavam, os movimentos eram descontínuos e com descoordenação de nadadeiras.

A diminuição da natação e a perda de equilíbrio são efeitos deletérios para os peixes pois ficam vulneráveis ao meio ambiente.

O alimento fornecido aos peixes, provocou pequeno estímulo verificado a partir do segundo dia de experimentação, caracterizado pelo aumento dos movimentos natatórios, às 10:00 e às 16:00 horas. Porém, os peixes não se alimentaram até 72 horas após a administração da droga; somente após 96 horas, esse comportamento tornou-se mais frequente. Dessa forma, TAGATZ (1976), estudando efeitos dos poluentes em bagres, observou evidente redução na alimentação e decréscimo na percepção da presença de alimento. SYMONS (1973), em estudo do comportamento de Salmo salar exposto ao fenitrothion, notou depressão na taxa de alimentação, sem que o mecanismo em curso fosse explicado.

Alimentação e comportamentos associados com predação podem ser uma somatória da atividade integrada de receptores da gustação, da linha lateral e de receptores visuais, olfatórios e viscerais internos. O poluente pode agir em um ou em todos esses receptores bem como influenciar o sistema nervoso central diretamente, causando alterações na neurotransmissão, como é o caso dos compostos organofosforados.

Além disso, os animais intoxicados, mantiveram-se

insensíveis à excitação luminosa não alterando seu processo natatório no início do ciclo luminoso, como ocorre nos peixes não intoxicados (Fig. 10).

Como o C. callichthys possui hábitos noturnos, geralmente permanecem a maior parte do dia em repouso, como foi relatado anteriormente. Porém, os peixes intoxicados demonstraram visível incremento no seu período de repouso (em torno de 90%) com postura em que permaneceram agrupados uns sobre os outros como se quisessem se esconder - ficar "entocados" - comportamento esse característico para muitas espécies de peixes. Também, apresentaram dificuldade em se manter totalmente apoiados no substrato, parecendo que haviam perdido a força e o controle sobre si mesmos (Fig. 14).

Supõe-se que, nessa situação o C. callichthys é submetido a um processo de redução no ritmo de suas atividades fisiológicas normais, que acaba por afetar as relações mutáveis que mantêm com o seu meio ambiente.

Toda a sintomatologia das alterações comportamentais citadas, tendeu a melhorar após 96 horas de intoxicação, fato que está demonstrado nas Figs. 12E a 18E, onde se percebe que a curva correspondente aos peixes intoxicados atinge com maior frequência, em várias horas do dia, os valores máximos e mínimos da curva controle, porém não com total normalidade.

O acompanhamento da intoxicação pelo Paration metílico foi feito com base nas determinações dos níveis de colinesterase plasmática de Callichthys callichthys em experimentos em

duplicata, isto é, com dois lotes de animais tratados de modo igual (Figs. 20 e 21).

Apesar das manifestações tóxicas serem devidas à inativação da acetilcolinesterase, a colinesterase plasmática é também inativada. Essa inativação e a sua medida proporcionam um teste conveniente para detectar o inseticida e monitorar o experimento.

Além disso, determinações da colinesterase plasmática proporcionam um método de estudo de intoxicação por organofosforado em peixes que evita o sacrifício dos animais, já que, na maior parte dos trabalhos que cuidam desse problema, a metodologia utilizada indica a necessidade da retirada do cérebro dos animais para sua respectiva análise.

A medida da colinesterase é comumente usada para diagnóstico, em laboratório clínico humano, para detectar indivíduos expostos a organofosforado. No caso presente, foi mudado o substrato utilizado de propioniltiocolina para iodeto de acetiltiocolina. Este último se mostrou adequado para a medida enzimática do peixe. O sangue humano apresenta uma atividade de colinesterase muito superior àquela presente nos peixes. Os aspectos cinéticos da colinesterase de plasma de Callichthys callichthys bem como a sua purificação são assuntos programados para estudos posteriores.

Nesse particular, o Callichthys callichthys revelou-se um animal de experimentação ideal para estudos dessa natureza, considerando-se que a colinesterase plasmática mostrou cerca de



90% de inibição, após 4 horas da administração da droga na cavidade celomática do peixe. Esse nível de inibição permaneceu inalterado por cerca de 8-9 dias, coincidindo com o pico das alterações nos sintomas comportamentais (Figs. 12 a 18), caracterizadas por diminuição da atividade natatória, da velocidade de natação, da procura de alimento e da própria alimentação, da extensão no tempo de repouso, da perda de equilíbrio, da descoordenação das nadadeiras com assincronia da natação, do agrupamento em repouso e outros.

Em outros estudos realizados com peixes e com outros organofosforados notou-se que a redução da atividade da acetilcolinesterase encefálica foi proporcional à concentração da substância administrada. WEISS (1958) estudou em peixes a ação de vários compostos organofosforados e as respostas proporcionadas pela medida da acetilcolinesterase do encéfalo. Notou que níveis baixos de organofosforado podem ser detectados pela medida da acetilcolinesterase encefálica. COPPAGE (1972) por sua vez, admitiu que somente com 87% de inibição da atividade da colinesterase encefálica pode-se admitir a exposição do peixe a um composto anticolinesterásico. BENKE & MURPHY (1974) compararam a toxicidade do paration etílico e do metílico e do azinfosmetil em camundongo e em peixe. O primeiro produziu rápida mudança na atividade da acetilcolinesterase após injeção intraperitoneal em "sunfish". O nível máximo de inibição foi alcançado com paration metílico com 2 a 4 horas, no fim de 4 horas com azinfosmetil e após 20 horas com paration, apesar dos dois últimos compostos

serem mais tóxicos que o primeiro para o peixe.

A atividade da colinesterase no eritrócito, nas guelras, no coração e no soro de truta foi reduzida com 3 horas de exposição ao acefato e de 1 hora após exposição ao fenitrothion (DUAMGSAWASDI & KLAVERKAMP, 1979). Com metamidofos, a inibição da acetilcolinesterase do encéfalo e do fígado foi proporcional à concentração do inseticida e ao tempo de exposição. Peixes menores começaram a morrer com 40 a 50% de inibição da acetilcolinesterase, enquanto os maiores sobreviveram a mais de 80% de inibição (CHIN & SUDDERUDDIN, 1979).

No presente trabalho, a análise comportamental foi feita até 120 horas após a administração do Folidol 600, enquanto que os níveis de colinesterase plasmática foram medidos durante 37 dias.

A partir do 8 dia, teve início a recuperação dos níveis de colinesterase plasmática, consequência provável da combinação de fatores como a detoxificação do próprio Paration metílico, e da síntese "de novo" da própria colinesterase. No 34 dia de experimentação, em um dos lotes, e 37 no outro, os níveis da enzima ativa atingiram cerca de 90%.

A reversão dos efeitos dos organofosforados está, assim, associada ao fenômeno do envelhecimento da enzima fosforilada (MURPHY, 1980). Com alguns compostos, a desfosforilação da enzima inibida ocorre muito lentamente. O diisopropilfluorofosfato (DFP) é um desses compostos e a taxa de regeneração da atividade da colinesterase do tecido de um animal

intoxicado coincide com a taxa de ressíntese da enzima. Exemplificando, em animais envenenados com DFP, a atividade da colinesterase plasmática retorna ao normal com vários dias a poucas semanas, em razão da substituição relativamente rápida da enzima inibida por nova enzima sintetizada no fígado.

POST E LEASURE (1974) verificaram que o tempo de recuperação dos níveis de acetilcolinesterase encefálica foi de 35 dias para Salmo gairdneri, 42 para Oncorhynchus kitusch e 25 para Salvelinus fontinalis. Por outro lado, KOELLE & GILMAN (1949) citam que algumas espécies animais podem exigir 3 meses para retornar aos níveis enzimáticos normais em músculo e cérebro, após inibição da colinesterase.

Houve, portanto, paralelismo muito estreito entre a inibição da colinesterase plasmática e os efeitos verificados quanto ao comportamento dos animais intoxicados, permitindo correlacionar ambos os fenômenos, isto é, o da atividade anticolinesterásica do Paration metílico com a sintomatologia observada.

A análise histopatológica dos animais intoxicados com Folidol 600 mostrou que tanto o parênquima hepático como o epitélio renal são alvos da ação tóxica desse material. Em Callichthys callichthys a partir de 72 horas da administração do Folidol 600, o fígado apresentou áreas de necrose e degeneração vacuolar, e o epitélio renal degeneração e necrose dos túbulos contornados proximais.

Em Tilapia rendalli foi verificado, em nosso

laboratório, que o Folidol 600 produz intensa vacuolização hepática após 4 horas de sua administração intracelomática (FANTA et al, 1988).

Entretanto, não há ainda como correlacionar o efeito da ação do Folidol 600 sobre a atividade da colinesterase plasmática com as lesões causadas ao hepatócito e ao epitélio renal, que se mostraram comprometidos. Se de um lado, a medida dos níveis de colinesterase do plasma pode ser usada com a finalidade de monitorar a intoxicação pelo Folidol 600, de outra parte, é bem provável que as lesões encontradas sejam o resultado da ação de solventes ou de outros componentes não revelados do Folidol 600, sobre o organismo do Callichthys callichthys e nada tenham a ver com o Paration metílico propriamente dito.

E admissível, contudo, a possibilidade de que os compostos organofosforados, a partir da propriedade que possuem de combinar-se com a serina do sítio ativo da colinesterase, experimentem propriedade semelhante com resíduos de serina de outras proteínas, podendo chegar a comprometer processos normais da atividade de órgãos como o fígado e o rim.

## V. SUMARIO

Para estabelecer os efeitos biológicos do inseticida organofosforado Folidol 600, cujo princípio ativo é o Paration metílico, foi utilizado, como animal experimental o Callichthys callichthys (LINNAEUS, 1758) (tamboatá, tamoatá, tambuatá, soldado do nordeste), um peixe Siluriforme da família Callichthidae, cujo habitat principal é a bacia do rio Paraguai, na região do Pantanal Matogrossense. Foram estabelecidos de início, os parâmetros comportamentais, a atividade enzimática da colinesterase plasmática e a morfologia renal e hepática normal dos tamboatás. Os níveis subletais de Folidol 600 foram determinados pela administração intracelomática de 2000, 1000, 500 e 250 mg de Folidol 600 por kg de peso do animal, correspondendo, respectivamente, a 1080, 540, 270 e 135 mg de Paration metílico por kg de peso. Foi verificado que doses de Folidol 600 de 2000 e 1000 mg por kg mostraram-se letais para o tamboatá, enquanto que na dose de 500 mg por kg, os animais sobreviveram e permitiram análise cuidadosa dos efeitos subletais desse organofosforado. Foram estudadas alterações do comportamento normal (motilidade, alimentação e respiração) dos peixes submetidos à ação do Folidol 600 (500mg/kg de peso) e, também, dos animais que receberam óleo de milho, veículo utilizado para administração do organofosforado. O panorama geral da intoxicação foi monitorado pela determinação da atividade da colinesterase plasmática, a partir de 4 horas da administração do inseticida, até 37 dias após. Estudos de alterações morfológicas

do fígado e do rim foram efetuados em animais dos grupos controles (normal e tratados com óleo de milho) e dos animais submetidos à ação do Folídol 600, sacrificados 4, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a intoxicação.

## ABSTRACT

To establish the biological effects of Folidol 600, an organophosphate insecticide, whose active principle is the methyl Parathion, the Callichthys callichthys (LINNAEUS, 1758) ("tamboatá, tamoatá, tambuatá and soldado do nordeste" - northeast soldier), was used as experimental animal. The Callichthys callichthys is a Siluriforme fish from the Callichthidae family, whose main habitat is the Paraguay river basin at "Pantanal Matogrossense". In the beginning, the behavioral parameters were established, as well as the levels of the plasmatic cholinesterase and the normal renal and hepatic morphology of the "tamboatás". The sublethal levels of Folidol 600 were determined by the intracelomatic application of 2000, 1000, 500, and 250 mg of Folidol 600 per kilo of the animal's weight, corresponding respectively to 1080, 540, 270 and 135 mg of methyl Parathion per kilo of weight. It was verified that doses of Folidol 600 of 2000 and 1000 mg per kilo were proved to be lethal for the "tamboatá", while in the 500 mg per kilo dose the animals survived, and careful analysis of the sublethal effects of this organophosphate were permitted. Alterations of the normal behavior were studied (motility, feeding and respiration) of fish submitted to the action of Folidol 600 (500 mg/kg of weight) and also of the animals that received corn oil-vehicle used for the administration of Folidol 600. The fish intoxication was monitored by the determination of the cholinesterase plasmatic activity from 4 hours on of the

insecticide administration, until 37 days after. Studies of the morphologic alterations of the liver and the kidney were carried out with animals of the control group (normal and inoculated with corn oil), and of the animals submitted to the action of Folidol 600, sacrificed 4, 24, 48, 72, 96 and 120 hours after the intoxication.



## VI. CONCLUSÕES

- 1 - Dose de 1000 mg por kg de peso de Folidol 600, correspondente a 540 mg do composto organofosforado Paration metílico por kg de peso, mostrou-se letal para o Callichthys callichthys.
- 2 - A dose de 500 mg de Folidol 600 por kg de peso, correspondente a 270 mg de Paration metílico/kg peso pode ser considerada subletal para o Callichthys callichthys, já que a sobrevivência dos animais testados foi de 100%.
- 3 - Na fase aguda do processo de intoxicação, correspondente às primeiras 120 horas, após a administração do Folidol 600, o Callichthys callichthys mostrou alterações comportamentais que se caracterizaram pela motilidade diminuída, descoordenação motora, com perda de equilíbrio e postura alterada e aumento da amplitude dos movimentos respiratórios.
- 4 - A colinesterase plasmática do Callichthys callichthys foi inibida em cerca de 90% de sua atividade, em medida efetuada 4 horas após a administração do Folidol 600, mantendo-se assim durante 8 a 10 dias.
- 5 - A partir do décimo dia da administração do Folidol 600, os níveis de colinesterase plasmática se elevaram, atingindo 90% de atividade do 34º ao 37º dia após o início do experimento.

- 6 - Fígado e rim de Callichthys callichthys são alvos da ação tóxica do Folídol 600. As lesões tornam-se mais evidentes após 120 da administração.
- 7 - As lesões evidenciadas pela administração do Folídol 600 em Callichthys callichthys foram, principalmente degeneração vacuolar nuclear e necrose focal no fígado e degeneração e necrose do epitélio tubular renal, mais acentuada nos túbulos contornados proximais.

## VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALABASTER, J. S. (1969). Survival of fish in 164 herbicides, insecticides, fungicides, wetting agents, and miscellaneous substances. Internat. Pest. Control. 11(2):29-35.
- ALDRIDGE, W. N. & JOHNSON, M. K. (1971). Side effects of organophosphorus and carbamates with esterases. Bull. WHO 44:25-30
- ANEES, M. A. (1978). Hepatic pathology in a freshwater teleost Channa punctatus (Bloch) exposed to sublethal and chronic levels of three organophosphorus insecticides. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 19:524-527.
- ANON (1959). Organophosphates progress. Jour. Ag. & Food Chem, Apr. 236-237.
- BAERENDS, B. P. (1971). The ethological analysis of fish behavior. In HOAR, W. S. & Randall, D. J; Eds. Fish Physiology, Academic Press, New York, 1971, pp. 279-370.
- BENKE, G. M. & MURPHY, S. D. (1974). Anticholinesterase action of methyl parathion, parathion and azinphosmethyl in mice and fish: onset and recovery of inhibition. Bull. Environ. Contam. & Toxicol. 12:117-122.
- BERNARD, C. (1857). Leçons sur les effets des substances toxiques. in WARBURG, O. (1946). Heavy metal prosthetic groups and enzyme action, Oxford at the Clarendon Press, Paris, 74:12.
- BUHLER, D. R.; RASMUSSEN, M. E. & SHANKS, W. E. (1969). Chronic oral DDT toxicity in juvenile coho and chinook salmon, Toxicol. Appl. Pharmacol, 14:535.
- CHABOUSSOU, F. (1980). Plantas doentes pelo uso de agrotóxicos: a teoria da trofobiose. Porto Alegre L& PM Ed., 253p.
- CHIN, Y. N. & SUDDERUDDIN, K. I. Effect of methamidophos on the growth rate and esterase activity of the common carp Cyprinus carpio L., Environ. Pollut. 18:213-216.
- COPPAGE, D. L. (1972). Organophosphate pesticides: specific level of brain AChE inhibition related to death in sheepshead minnows. Trans. Am. Fish. Soc. 101:534.
- COPPAGE, D. L.; MATTHEWS, E.; COOK, G. H. & KNIGHT, J. (1975). Brain acetylcholinesterase inhibition in fish as a diagnosis of environmental poisoning by malathion, 0,0-dimethyl s-(1,2-dicarbethoxyethyl phosphorodithioate. Pestic. Biochem. Physiol. 5:536.

- COUCH, J. A. (1975). Histopathological effects of pesticide and related chemicals on the livers of fishes, in the pathology of fishes, William, E. R. & Migok. G. Eds, University of Wisconsin Press, Madison, 559.
- DIETZ, A. A.; RUBINSTEIN, H. M. & LUBRANO, T. (1973). Colorimetric determination of serum cholinesterase and its genetic variants by the propionylthiocholinedithiobis (nitrobenzoic acid) Proc. Clin. Chem. 19(11):1309-1313.
- DUANGSAWASDI, M. & KLAVERKAMP, J. F. (1979). Acephate and fenitrothion toxicity in rainbow trout: effects of temperature stress and investigations on the sites of action, in Aquatic Toxicology, ASTM STP 667, Marking, L. L. and Kimerle, R. A., Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 35.
- DU BOIS, K. P.; DOULL, J.; SALERNO, P. R. & COON, J. M. (1949). Studies on the toxicity and mechanisms of action of p-nitrophenyl diethyl thionosphosphate (parathion). J. Pharmacol. Exp. Ther., 95:79-91.
- ELLER, L. L. (1971). Histopathological lesions in cutthroat trout (Salmo clarki) exposed chronically to the insecticide endrin. Am. J. Pathol. 64:321.
- ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES, Jr. V. & FEATHERSTONE, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Bioch. Pharm. 7:88-95.
- FANTA, E.; SILVA, H. C.; CIRIO, S. M.; POLACK, E. W. & MERLIN, E. (1988). Estudos preliminares dos efeitos de um organofosforado em Tilapia rendalli. Anais do VI Congresso Brasileiro de Biologia Celular, Brasília, p. 13.
- FANTA, E.; LUCHIARI, P. H. & BACILA, M. (1989). Circadian rhythm of oxygen consumption and oxygen levels in the muscle of Notothenia neglecta (Pisces, Teleostei). Comp. Biochem. Physiol. 93A(4):819-831.
- FANTA, E.; LUCHIARI, P. H. & BACILA, M. (1989). The effect of environmental oxygen and CO<sub>2</sub> levels on the tissue oxygenation and the behavior of antarctic fish. Comp. Biochem. Physiol. 93A:819-832
- FANTA-FEOFILOFF, E. (1983). Temperature and low oxygen tolerance in three species of fresh water Pimelodidae (Teleostei, Siluriformes). Arq. Biol. Tecnol. 26(4):495-508.
- FANTA-FEOFILOFF, E.; BRITO EIRAS, D. R.; BOSCARDIM, A. T. & LACERDA-KRAMBECK, M. (1986). Effect of salinity on the behavior and oxygen consumption of Mugil curema (Pisces, Mugilidae).

Physiol. & Behav. 36:1029-1034.

FANTA-FEOFILOFF, E.; TAKAHASHI, M. S. & BOSCARDIM, A. J. (1983). Behavioural changes with temperature increase in the Ariidae

Genidens genidens (Teleostei, Siluriforme). Arq. Biol. Tecnol. 26(4): 535-544.

FONTAINE, M. (1980). La polución de las aguas marinas. Ed. Omega, S. A. Barcelona 187 p.

HOFFMAN, C. H. (1960). Are the insecticides required for insect control hazardous to aquatic life? Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, U.S.P.H.S., Cincinnati, Ohio. Technical Report W60-3:51-61.

HOLMSTEDT, B. O. (1959). Pharmacology of organophosphorus cholinesterase inhibitors. 11(3):688p.

KABEER AHAMMAD SAHIB, I. & PRASADA RAO, K. S. (1980). Correlation between subacute toxicity of malathion and acetylcholinesterase inhibition in the tissues of the teleostei Tilapia mossambica. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 24:711-718.

KAMARAGURU, A. K.; BEAMISH, F. W. H. & FERGUSON, H. W. (1982) Direct and circulatory paths of permethrin (NRDC-143) causing histopathological changes in the gills of rainbow trout, Salmo gairdneri Richardson. J. Fish. Biol. 20:87.

KENDALL, M. W. (1975). Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish (Ictalurus punctatus) Kidney. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 13:570.

KENDALL, M. W. (1977). Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish (Ictalurus punctatus) liver. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18:143.

KOELLE, G. B. & GILMAN, A. (1949). Anticholinesterase drugs. J. Pharm. & Exp. therapeutics 95:166-216.

LARINI, L. (1979). Toxicologia dos Inseticidas. São Paulo: Sarvier 172p.

LEUZINGER, W.; BAKER, A. L. & CALVIN, E. (1968). Acetylcholinesterase. II. Crystallization, absorption spectra, isoionic point. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59:620-623.

LILLIE, R. D. (1977). H. J. Conn's Biological Stains. The Williams & Wilkins Company Baltimore, USA. 9<sup>o</sup> ed. 692 pp.

- LINGARAJA, T. & VENUGOPALAN, V. K. (1978). Pesticides induced physiological and behavioural changes in an estuarine teleost Therapon jarbua (Forsk) Fish Technol. 15:115-119.
- LINNAEUS, C. 1758. Syst. Nat., ed 10, pct. 2:307 in Fowler, H.W. Os peixes de água doce do Brasil. (1954) Arq. Zool. São Paulo IX:47.
- LOWRY, O.H.; ROSEMBROUGH, H.J.; FARR, A. L. & RANDALL, J. R. (1961). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-276.
- LUCCHIARI, P. H.; FANTA, E. & BACILA, M. (1989). The effect of temperature on the muscle oxygen levels in Antarctic fish. Proc. MIPR Symp. Polar Biol. 2, 117-122.
- MEDINA, H. S. G.; GREMSKI, V.; CURIEL, O; WAHRHAFTIG, C.; SILVA, H. C.; MERLIN, E; SOUZA, S. J.; WAL, D. (1988). Alterações estruturais e ultraestruturais produzidas em peixes e mamíferos por fitormônios clorados. Anais da Academia Brasileira de Ciências. 60(2) p.252.
- METCALF, R. L. (1955). Organic insecticides. Their chemistry and mode of action. Interscience Publishers, New York and London, vol. I.
- MURPHY, S. D. (1980). Pesticides. In, Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 2 ed. (Doull, J.; Klasser, C. D. & Amdur, M. O.; eds) Macmillan Publishing Co., Inc., New York pp. 357-408.
- MURTY, A. S. (1986). Toxicity of pesticides to fish. CRC Press, Inc. 2<sup>o</sup> ed. 2:143p.
- NEAL, R. A. (1967). Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionate (parathion) in vitro. Biochem. J., 103:183-191.
- O'BRIEN, R. D. (1967). Insecticides: Action and Metabolism. Academic Press, New York, London. vol 1.
- PALAWSKI, D.; BUCKLER, D. R. & MAYER, F. L. (1983) Survival and condition of rainbow trout (Salmo gairdneri) after acute exposures to methyl parathion, triphenyl phosphate and DEF Bull Environ. Contam. Toxicol. 30: 614-620.
- PATURLE, G. (1975). Pesca, peixes e pescaria. Itatiaia, Belo Horizonte, 595 p.
- PEARSE, Q. G. E. (1953). Histochemistry theoretical and applied J & A Churchill LTD, London, 530 p.

- PETERS, R. A. (1949). The study of enzymes in relation to selective toxicity in animal tissues. Symp. Soc. Exp. Biol. 3:36-59
- PETERS, R. A. (1952). Synthesis Lethal. Proceed. Royal Soc. 139(B):143-170.
- PICKERING, Q. H. & HENDERSON, C. (1959). Monitoring for BW and CW agents in water with fish. Robert A. Taft Sanitary Engineering Center, U.S.P.&S., Cincinnati, Ohio. Technical Report W59-2:119-133
- PICKERING, Q. H.; HENDERSON, C.; & LENKE, A. E. (1962). The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warmwater fishes. Trans. Am. Fish. Soc. 91:(2), 175-184.
- POST, G. & LEASURE, R. A. (1974) Sublethal effect of malathion to three salmonid species. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 12(3):312-319.
- RAND, G. M. (1977). The effect of exposure to a subacute concentration of parathion on the general locomotor behavior of the goldfish. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18(2):259-266.
- REICHENBACH-KLINKE, H-H (1980). Enfermedades de los peces. Acribia, Espanha. 507p.
- SALTE, R.; SYLVERTSEN, C.; KJONNOY, M. & FRODE, F. (1987). Fatal acetylcholinesterase inhibition in salmonids subjected to a routine organophosphate treatment. Aquaculture 61:173-179.
- SILVA, H. C.; FANTA, E. & SANTA CRUZ, E. (1988). Ritmo biológico do comportamento de Callichthys callichthys (Pisces, Teleostei). Livro de Resumos da 40<sup>o</sup> Reunião Anual da Soc. Bras. Prog. Ciên. 40(7):909.
- SPRAGUE, J. B. (1971). Measurement of pollutant toxicity to fish-III, sublethal effects and "SAFE" concentrations. Water Res. 5:245-266.
- SPRAGUE, J. B. (1973). The ABC's of pollutant bioassay using fish. Ass. Water Quality, American Society for Testing and Material pp.6-30.
- SUPERINTENDÊNCIA DOS RECURSOS HIDRICOS E MEIO AMBIENTE (1984). Levantamento quantitativo e qualitativo dos princípios ativos de agrotóxicos utilizados e das principais culturas agrícolas nas bacias hidrográficas do Paraná no ano de 1984 Caderno Técnico nº 4.

- SYMONS, P. E. K. (1973). Behavior of young Atlantic salmon (Salmo salar) exposed to or force-fed fenitrothion, an organophosphate insecticide. J. Fish. Board. Can. 30(5):651-655.
- TAGATZ, M. E. (1976). Effect of mirex on predator-prey interaction in an experimental estuarine ecosystem. Trans. Am. Fish. Soc. 105:546.
- THE MERCK INDEX (1968). Rahway, N. J., Merck & CO., 8<sup>o</sup> ed. 1713 pp.
- VERMA, S. R.; TYAGI, A. K.; BHATNAGAR, M. C. & DALELA, R. C. (1979). Organophosphate poisoning to some freshwater teleosts - acetylcholinesterase inhibition. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 21:502.
- WARBURG, O. (1911). Z. F. Physiolog. Chemie, 70:413. in WARBURG, O. (1946). Heavy metal prosthetic groups and enzyme action, Oxford at the Claredon Press, 74:12.
- WARBURG, O. (1926). Biochem.Z. 177,471 in WARBURG, O. (1946). Heavy metal prosthetic groups and enzyme action, Oxford at the Claredon Press, 74:12.
- WEIS, P. (1974) Ultrastructural changes induced by low concentrations of DDT in the livers of the zebrafish and guppy. Chem. Biol. Interact. 8:25.
- WEISS, C. M. (1958). The determination of cholinesterase in the brain tissue of three species of fresh water fish and its inactivation in vivo. Ecology 39(2):194-199.
- WILLIAMS, A. K. & SOVA, C. R. (1966). Acetylcholinesterase levels in brains of fishes from polluted waters. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1:158-204.